

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

BERICHTIGTE FASSUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. September 2004 (10.09.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/075907 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A23L 1/28,
A61K 35/70, 35/84, 31/26, 31/275, 9/16, 9/51, A61P
31/00, 37/04, 39/06

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2004/000421

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Februar 2004 (27.02.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 09 681.7 27. Februar 2003 (27.02.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): ERNST-MORITZ-ARNDT-UNIVERSITÄT
GREIFSWALD [DE/DE]; Domstrasse 11, 17487 Greif-
swald (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): JUELICH, Wolf-Di-
eter [DE/DE]; Wollweberstrasse 9, 17489 Greifswald
(DE). LUKOWSKI, Gerold [DE/DE]; Birnenweg 35,
17489 Greifswald (DE). LINDEQUIST, Ulrike [DE/DE];
Lise-Meitner-Strasse 6, 17491 Greifswald (DE).

(74) Anwalt: WEHLAN, Martin; Paul-Gesche-Strasse 1,
10315 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 13. Januar 2005

(48) Datum der Veröffentlichung dieser berichtigten
Fassung: 24. Februar 2005

(15) Informationen zur Berichtigung:
siehe PCT Gazette Nr. 08/2005 vom 24. Februar 2005,
Section II

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: SALUTARY COMPOSITIONS CONSISTING OF FUNGI CONTAINING LIPIDS AND THIOCYANATES

(54) Bezeichnung: GESUNDHEITSFÖRDERNDE ZUSAMMENSETZUNGEN AUS LIPIDHALTIGEN PILZEN UND THIO-
CYANATEN

(57) Abstract: The invention relates to salutary compositions, which consist of biomasses of fungi containing lipids and thiocyanates and which can contain additional active substances. The biomasses can be cultivated in the presence of thiocyanates. Microparticles and nanoparticles, preferably with an average diameter of between 10 nm and 10 µm can be obtained by the conversion of the biomasses. Potential areas of application are medicine, foodstuff manufacture, a prophylactic application for humans and animals and the treatment of infectious diseases.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft gesundheitsfördernde Zusammensetzungen, die aus Biomassen lipidhaltiger Pilze und Thiocyanaten bestehen und zusätzliche Wirkstoffe enthalten können. Die Biomassen können in Gegenwart von Thiocyanaten kultiviert werden. Durch Umwandlung der Biomassen werden Mikro- und Nanopartikel gewonnen, die vorzugsweise einen mittleren Durchmesser von 10 nm - 10 µm besitzen. Mögliche Anwendungsgebiete sind die Medizin, die Nahrungsmittelherstellung, die prophylaktische Anwendung bei Mensch und Tier und die Therapie von Infektionskrankheiten.

WO 2004/075907 A3

Best Available Copy

Gesundheitsfördernde Mittel aus lipidhaltigen Pilzen

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft gesundheitsfördernde Mittel, die aus Biomassen lipidhaltiger Pilze und Thiocyanaten bestehen und zusätzliche Wirkstoffe enthalten können. Die Biomassen können in Gegenwart von Thiocyanaten kultiviert werden. Durch Umwandlung der Biomassen werden Mikro- und Nanopartikel gewonnen, die vorzugsweise einen mittleren Durchmesser von 10 nm - 10 µm besitzen. Mögliche Anwendungsgebiete sind die Medizin, die Nahrungsmittelherstellung, die prophylaktische Anwendung bei Mensch und Tier und die Therapie von Infektionskrankheiten.

[0002] Für den Einsatz von Pilzen als Nahrungs- oder Nahrungsergänzungsmittel gibt es mehrere Möglichkeiten. Am häufigsten ist die Verwendung der Fruchtkörper als Speise- oder Würzmittel. Ebenfalls praktiziert wird die großtechnische Produktion von Pilzmycel mit biotechnologischen Verfahren. Ein Beispiel für ein biotechnologisches gewonnenes Produkt ist ein Health Food-Produkt aus *Fusarium graminearum*, das durch seine niedrigen Energie und hohen Ballaststoffwerte sowie ein günstiges Lipidprofil direkt für die menschliche Ernährung genutzt wird (Moore-Landecker, E.: Fundamentals of the fungi, fourth edition, 545, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey 07458 (1996); Abbcy, C.D. V.: Fungi as source of food; Nutriations and Food Science, 85 , 2-9 (1983).

[0003] Der Lipidgehalt von Pilzen kann von weniger als 1 % bis zu 15- 20 % des Trockengewichtes schwanken. Im Mittel kann mit etwa 2 bis 8 % gerechnet werden. Pilzfett enthält alle Arten von Lipiden wie freie Fettsäuren (überwiegend ungesättigte Fettsäuren), Mono-, Di-, und Triglyceride, Sterole (speziell Ergosterol), Sterolester sowie Phospholipide (Breene, W. M.: Nutritional and medicinal value of speciality mushrooms, Journal of Food Protection 53, 883-894(1990).

[0004] Thiocyanate sind in der Natur nahezu ubiquitär verbreitet. Thiocyanate werden im Säugetierorganismus gebildet und daher vom Menschen mit der pflanzlichen und tierischen Nahrung ständig aufgenommen. In folgenden Situationen wurde eine zusätzliche Zufuhr von Thiocyanaten als gesundheitsfördernde Maßnahme bei Mensch und Nutztier empfohlen (Medizinische und biologische Bedeutung der Thiocyanate (Rhodanide) Hrsg. W. Weuffen, VEB Verlag Volk und Gesundheit Berlin 1982):

- Impfprophylaxe. Wird während der Antigenzufuhr der Thiocyanat-Haushalt optimiert, dürfte die zu erwartende Immunantwort früher einsetzen und stärker ausfallen
- Steigerung der unspezifischen Infektabwehr. In Phasen erhöhter Belastung (z.B. Frühgeborene, erhöhte Infektionsgefährdung bei gehäuft auftretenden respiratorischen Infekten oder bei Virusgrippe, in der Tierhaltung Aufstellungsperiode) dürfte die Optimierung der Immunantwort mit Thiocyanaten aussichtsreich sein.
- Anwendung bei Erkrankungen mit Beteiligung des Immunsystems. Bei derartigen Erkrankungen, z.B. des rheumatischen Formenkreises, asthmatischen Erkrankungen, allergischen Hauterkrankungen und evtl. Neoplasmen ergeben sich möglicherweise therapeutische Konsequenzen.
- Schutzeffekt bei toxischen Belastungen.
- Als Nutritivum in der Tierhaltung

Für die grundsätzliche Bedeutung einer ausreichenden Thiocyanatzufuhr mit der Nahrung bzw. dem Futter wurden bei Mensch und Nutztier zahlreiche Belege erbracht (Bredereck, G., W.-D. Jülich, W. Weuffen und W. Schindler: Anwendung von anorganischen Rhodaniden bei der Ferkelaufzucht. Arch. exp. Vet. med. 1977; 31: 665 – 670

Kramer, A., W. Weuffen, A. Apitzsch und W.-D. Jülich: Stimulation of Antibodies and Liver Protection with Thiocyanate during Rabies Vaccination Annals of Allergy. 1985; 55: 405
Weuffen, W., A. Kramer, H. Ambrosius, V. Adrian, H. Below, W.-D. Jülich, St. Koch, B. Thürkow und F. Verbeck: Zur Bedeutung des endogenen Wirkstoffs und Umweltfaktors Thiocyanat. Zbl. für Hygiene und Umweltmedizin 1990; 423: 615 - 652

Weuffen, W., A. Kramer, H. Below, H. Böhlend, W.-D. Jülich, B. Thürkow und U. Burth: Das Thiocyanation als physiologisch bedeutsamer Wirkstoff in der belebten Natur. Pharmazie 1990; 45: 16 – 30

Kramer, A., W.-D. Jülich und A. Schulz: Alimentäre Bedeutung von Thiocyanat. Hyg. Med. 1993; 18: 56

Jülich, W.-D., A. Kramer, V. Hingst, H.-G. Sonntag, C. Schütt, M. Daut, A. Schulz, G. Bahlmann, H. Zöllner, R. Hampel, E. Panzig: Untersuchungen zur Stimulierung der Immunantwort bei der Hepatitis-B-Schutzimpfung durch eine alimentäre bei Thiocyanatsupple-

mentierung bei gesunden Probanden und bei Dialysepatienten. Umweltmed Forsch Prax 1997; 2: 71-83

[0005] Die Anwendung der Thiocyanate zu den von Weuffen empfohlenen Zielstellungen hat sich bisher trotz der gut dokumentierten positiven Effekte nicht durchgesetzt. Ein wesentlicher Grund dürfte daher die Schwierigkeit sein, eine geeignete Applikationsform für die Thiocyanate zu finden. Man hat deshalb sogar versucht, eine Anreicherung von Thiocyanat zu erreichen und entsprechende Produkte für diätetische Zwecke einzusetzen (Zöllner, H., A. Kramer, W.-D. Jülich, Ch. Bimek: Increasing the yield and improving the quality of spelt after fertilization with thiocyanate. J. Plant Nutr. Soil Sci. 164 (2001), 105-106).

[0006] Die Verkapselung von Wirkstoffen gestattet eine hohe Wirkstoffbeladung und eine gleichmäßige Abgabe des Wirkstoffes (Eur. J. Pharm and Biopharm 52(2001) 159-163). Die Verkapselung des Modellwirkstoffes ermöglichte eine in vivo Freigabe in einem Zeitraum 8 Stunden. Bei der Herstellung von Nano- und Mikropartikeln sind verschiedene Herstellungsverfahren auf Basis von Lipiden bereits bekannt. So wurden bereits Verfahren zur Herstellung von Lipid-Mikropartikeln auf Basis von Phospholipiden beschrieben, die antimykotische Eigenschaften haben und im pharmazeutischen oder kosmetischen Bereich eingesetzt werden können (DE 69 00 2905 T2). Andere Verfahren beschreiben Lipidnanopartikel auf Basis von extrahierten Mono-, Di und Triglyceriden, Ölen oder Wachsen. Mit Hilfe dieser gewonnenen Lipide werden ebenfalls pharmazeutische Wirkstoffe verkapselt (WO 94/20072 A1). Weitere Lipidnanopartikel beschreiben Substanzen ebenfalls auf Basis von Lipiden zur parenteralen Anwendung (WO 98/56362 A1). Auch werden spezielle Techniken zur Herstellung von Lipidnanopartikeln vorgestellt (z. B. EP 0 526 666 A).

Nachteile des Standes der Technik

[0007] Insbesondere die Verwendung von Antibiotika, die auch in der Humanmedizin verwendet werden, als Medizinalfuttermittel ist zu Recht zunehmend in die Kritik geraten.

[0008] Kein bisher verwendetes Futterergänzungsmittel erfüllt alle Anforderungen der Tierzucht in Bezug auf Wirksamkeit und Vermeidung von Nebenwirkungen.

[0009] Auch im Bereich der menschlichen Ernährung ist es bisher nicht im ausreichenden Maß gelungen, die vitalisierenden Wirkungen physiologischer Wirkstoffe wie dem Thiocyanat und natürlicher Inhaltstoffe der Heilpilze zu nutzen.

[0010] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, neue Wirkstoffe und Wirkstoffträger mit gegenüber dem Stand der Technik verbesserten Eigenschaften für verschiedene Zwecke bereitzustellen.

5 **[0011]** Die Aufgabe wurde durch gesundheitsfördernde Mittel, die aus lipidhaltigen terrestrischen Pilzen einerseits und anorganischen Thiocyanaten oder Thiocyanaten organischer Basen
andererseits, gelöst.

[0013] Erfindungsgemäß wurden die Biomassen des Mycels und/oder des Fruchtkörpers auf kostengünstigem direktem Weg mit den Thiocyanaten zu den neuartigen Substanzen mit speziellen Wirkungen umgesetzt. Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können weitere zusätzliche Wirkstoffe enthalten.

5 [0014] Überraschenderweise hat sich herausgestellt, dass es gelungen ist, die gesundheitsfördernden Inhaltsstoffe der lipidhaltigen marinen Organismen besonders effizient zu nutzen und verschiedene Anwendungen zu ermöglichen, die mit den nativen Biomassen nicht erreicht werden können.

[0015] Eine vorteilhafte Ausführungsform der Erfindung besteht darin, als Biomasse kultivierte terrestrische Pilze einzusetzen, wobei die Kultivierung in Gegenwart von anorganischen Thiocyanaten oder Thiocyanaten organischer Basen erfolgt. Während der Kultivierung ist es möglich, eine Anreicherung mit Wirkstoffen durch Zusätze zum Kulturmedium zu erreichen.

10 [0016] So ist es möglich, Wirkstoffträger mit gegenüber dem Stand der Technik verbesserten Eigenschaften für Thiocyanate, Vitamine und andere Wirkstoffe für verschiedene Zwecke bereitzustellen, die die natürlichen Inhaltsstoffe in besonderer Weise nutzen.

[0017] Auf diese Weise ist es gelungen, die gesundheitsfördernden Inhaltsstoffe der Pilze besonders effizient zu nutzen. Gleichzeitig kann die Biomasse der Pilze nach Umwandlung in Mikro- und Nanopartikel als Wirkstoffträger für die Mineralstoffe und/oder Radikalfänger und/oder Vitamine und/oder Nahrungsergänzungsstoffe und andere Wirkstoffe dienen. Da-

20 durch werden verschiedene Anwendungen ermöglicht, die mit den Einzelkomponenten nicht erreicht werden können. Gegenstand der Erfindung ist somit auch eine Zusammensetzung aus Biomassen lipidhaltiger Pilze und Mineralstoffen und/oder Radikalfängern und/oder Nahrungsergänzungsstoffen und/oder Vitaminen, insbesondere Vitamin C.

25 [0018] Die Umwandlung in Mikro- und Nanopartikel kann vorteilhaft aus dem Mycel der Pilze im Anschluss an die biotechnologische Gewinnung vorgenommen werden, wobei die Anreicherung mit Wirkstoffen durch Zusätze zum Kulturmedium während der biotechnologischen Gewinnung erfolgt. Ebenso ist es möglich, die Anreicherung mit Wirkstoffen während der weiteren Verarbeitung vorzunehmen.

30 [0019] Insbesondere ist es gelungen, Medizinalfuttermittel zu entwickeln, die keine Antibiotika enthalten.

[0020] Für verschiedene Anwendungen ist es vorteilhaft, Fruchtkörper und/oder Mycel von einem der nachfolgend aufgeführten Pilze zu verwenden:

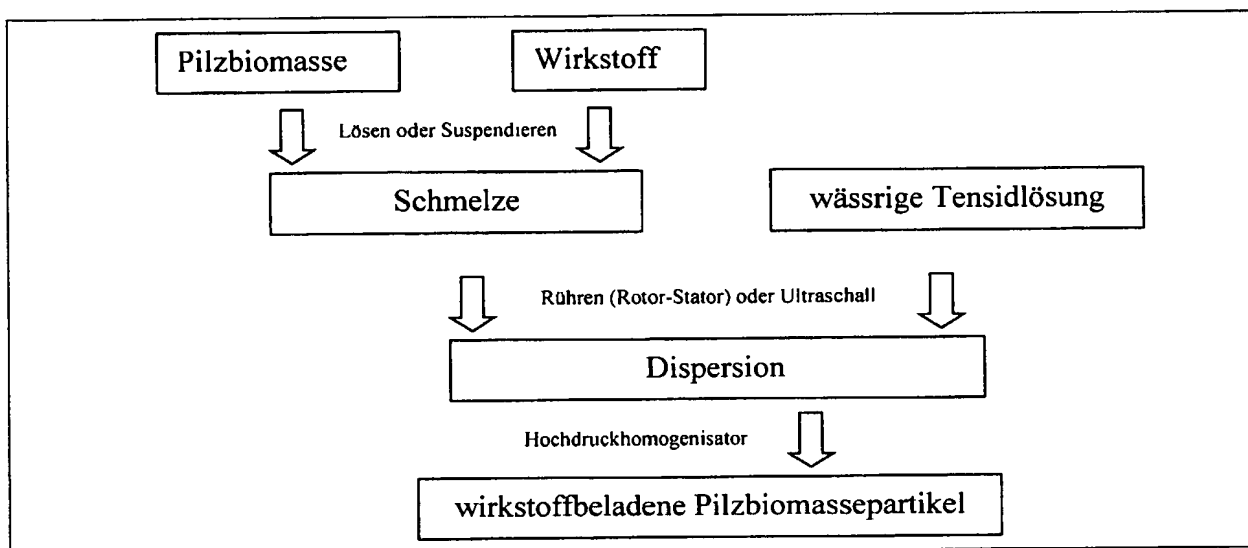
- a) *Auricularia auricula-judae* – Judasohr
- 35 b) *Ganoderma lucidum* – Glänzender Lackporling
- c) *Grifola frondosa* – Maitake

- d) *Hericium erinaceus* – Igelstachelbart
- e) *Lentinula edodes* – Shii-take

[0021] Die Umwandlung in Mikro- und Nanopartikel führt zu neuen, wertvollen Produkten, die auf bekannten Wegen nicht erreicht werden können und enthält drei Alternativen:

1. Homogenisationsverfahren

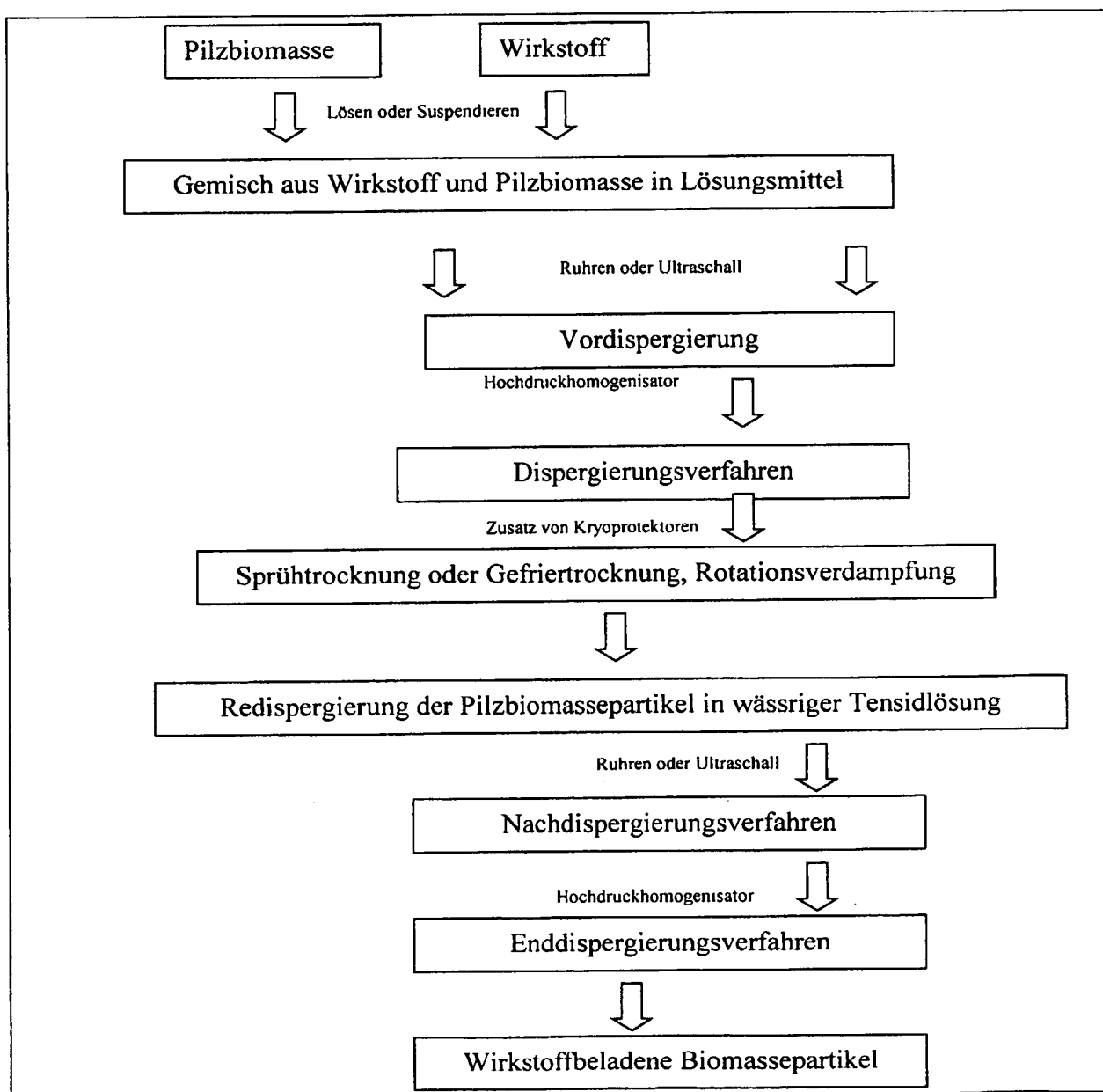
Schema 1: Herstellungsprozess von wirkstoffbeladenen Pilzbiomassepartikeln (Homogenisationsprinzip)



[0022] Die lipidhaltigen Pilze werden zunächst erwärmt, so dass eine Verflüssigung der darin enthaltenen Fettsäuren erreicht wird. In diese Biomasse werden ein oder mehrere Wirkstoffe (fest oder flüssig) hinzugegeben (Schema 1). Der Wirkstoff wird in den Fettsäuren der lipidhaltigen Pilze suspendiert, dispergiert bzw. adsorbiert. Parallel dazu wird ein Tensid-Wasser-Gemisch hergestellt. Dieses Tensid-Wasser-Gemisch wird auf eine Temperatur oberhalb der Schmelztemperatur der Fettsäuren erwärmt. Die beiden Phasen werden bei der gewählten Temperatur vereint. Anschließend wird mit Hilfe eines Rührers (Rotor-Stator-Prinzip) oder mit Hilfe von Ultraschall eine Vorsuspension hergestellt. Die Vorsuspension wird danach mit Hilfe eines Hochdruckhomogenisators homogenisiert, wobei die Zahl der Homogenisationszyklen und der Arbeitsdruck nach der erwünschten Partikelgröße und Stabilität der Zubereitung gewählt werden. Zwischen den einzelnen Zyklen ist darauf zu achten, dass die Herstellungstemperatur immer wieder eingestellt wird. Das Tensid dient zur Stabilisierung der Suspension.

[0023] Sollte es bei der Herstellung Probleme mit der Höhe der Temperatur (z. B. empfindliche Wirkstoffe) geben, so besteht die Möglichkeit, das gesamte Verfahren auch bei Raumtemperatur durchzuführen. In diesem Falle wird das Verfahren in gleicher Weise, wie zuvor beschrieben, durchgeführt, wobei der Wirkstoff an den lipidhaltigen marinen Mikroorganismen adsorbiert oder bei Zusatz einer geringen Wassermenge dispergiert wird.

Schema 2: Herstellungsprozess von Biomassenpartikeln (Lösungsmittel-Homogenisations-Verfahren)

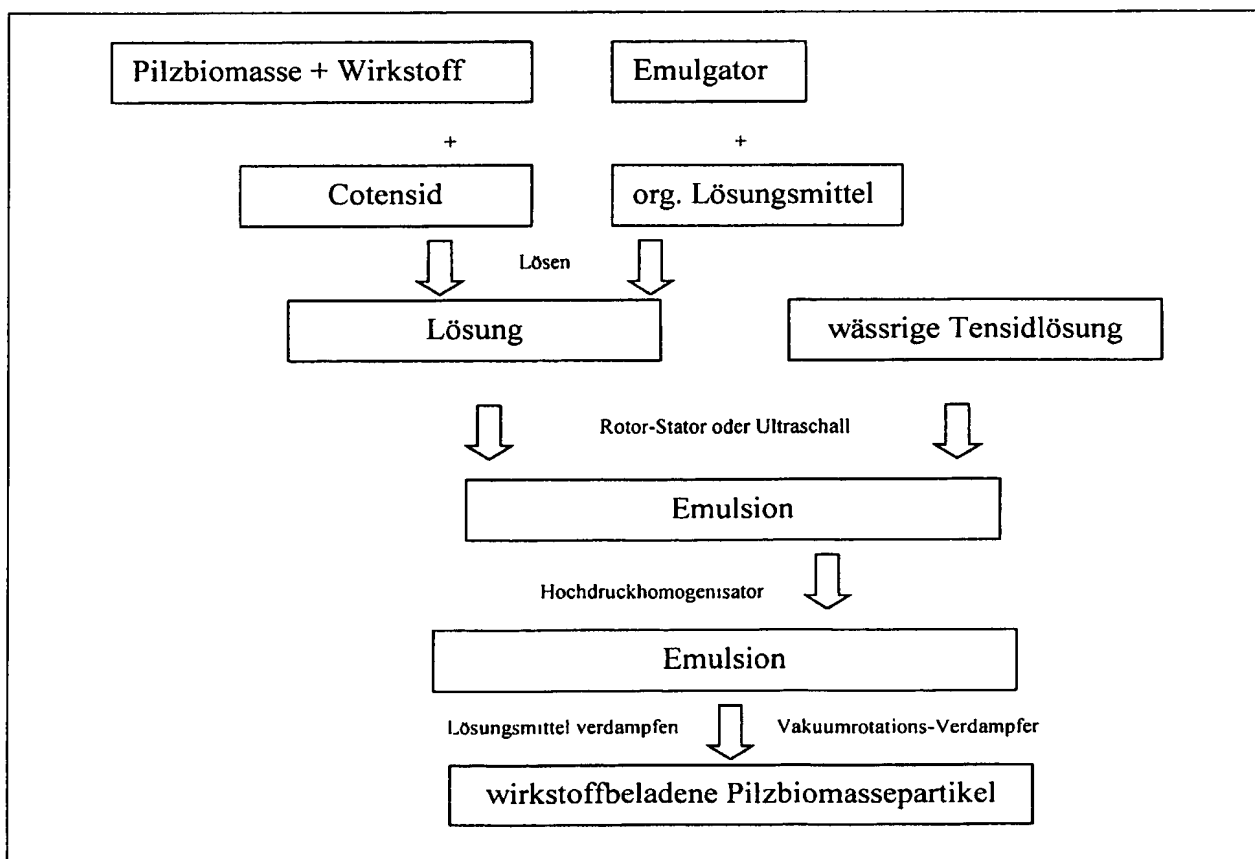


2. Lösungsmittel-Homogenisations-Verfahren

[0024] Die lipidhaltigen Pilze und der Wirkstoff werden in einem verdampfbaren organischen Lösungsmittel suspendiert. Danach wird dieses Gemisch vordispersiert (Stator-Rotor-Prinzip oder Ultraschall), homogenisiert (Hochdruckhomogenisator) und anschließend sprühgetrocknet oder gefriergetrocknet (Schema 2). Beim Gefrieretrocknen ist zu beachten, dass geeignete Kryoprotektoren eingesetzt werden. Es besteht darüber hinaus auch die Möglichkeit, das organische Lösungsmittel durch geeignete Verdampfer (z. B. Rotationsverdampfer) zu entfernen. Anschließend können die Partikel aus Pilzen in geeigneten wässrigen Tensid-Lösungen redispersiert werden. Danach ist eine erneute Dispergierung (Stator-Rotor-Prinzip oder Ultraschall) und Homogenisierung (Hochdruckhomogenisator) notwendig.

3. Lösungsmittel-Emulsions-Verfahren

Schema 3: Herstellungsprozess nach dem Lösungsmittel-Emulsions-Verfahren



[0025] Dieses Verfahren basiert auf der Bereitung einer Emulsion aus Wasser und einer Lösung der Biomasse aus Pilzen -Wirkstoff in einem geeigneten organischen Lösungsmittel (Schema 3). Dazu wird ein Emulgator zur Dispergierung des Biomasse-Wirkstoffes eingesetzt. Emulgator und Biomasse werden in einem geeigneten organischen Lösungsmittel gelöst. Zu dieser Lösung wird eine wässrige Phase, die ein wasserlösliches Cotensid enthält, hinzugefügt. Danach wird dieses Gemisch vordispersiert (Stator-Rotor-Prinzip oder Ultraschall). Nach einem Homogenisationsschritt mit Hilfe eines Hochdruckhomogenisators wird das organische Lösungsmittel durch Verdampfen entfernt, wobei die Wirkstoff enthaltende Biomasse in Form von festen Partikeln ausfällt.

[0026] Die Anwendung dieser Verfahren führt zu neuartigen Biomasse- Wirkstoff - Partikeln mit einem mittleren Durchmesser, der je nach Herstellungsart zwischen 10 nm und 10 µm liegt.

[0027] Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen sind auch ohne die Zugabe von einem zusätzlichen Wirkstoff wirksam, weil durch das erfindungsgemäße Verfahren die wertvollen Inhaltsstoffe der Pilze besser verfügbar gemacht werden. Auf diese Weise ist es möglich, Inhaltsstoffe der Pilze wie Proteine, Mineralien und Vitamine, mehrfach ungesättigte Fettsäuren, Produkte des Sekundärstoffwechsels sowie Aroma- und Geschmacksstoffe in besonders günstiger Form zu nutzen.

[0028] Die vorgestellten Prinzipien sind darüber hinaus geeignet, verschiedene gesundheitsfördernde Komponenten und/oder Mineralstoffe und/oder Radikalfänger und/oder Vitamine und/oder Nahrungsergänzungstoffe in die Biomassen einzulagern. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren werden ultrafeine feste Partikel im kolloidalen Größenbereich von etwa 15-1000 nm hergestellt. Das biologisch aktive Material bzw. das Wirkstoffmolekül kann sich in der festen Matrix (Nano-pellet) oder Hülle (Nanokapsel) im gelösten oder hochdispersen Zustand eingeschlossen, umhüllt, an den Randzonen adsorbiert oder adhäriert befinden.

[0029] Zusätzlich können erfindungsgemäß ein oder mehrere pharmazeutische Wirkstoffe in die Mikro- und Nanopartikel inkorporiert werden.

[0030] Erfindungsgemäß können die Zusammensetzungen aus Biomassen lipidhaltiger Pilze in Kombination mit Thiocyanaten und/oder Hydrothiocyanaten organischer Basen auch ohne

die Umwandlung in Mikro- und Nanopartikel eingesetzt und als gesundheitsfördernde Mittel verwendet werden oder aber zur Herstellung gesundheitsfördernder Mittel dienen.

[0031] Die erfindungsgemäße Herstellung hat den Vorteil, dass die Freisetzung der inkorporierten Substanzen durch Wahl der Temperatur, der Wirkstoffe und der Tenside gesteuert werden kann. Erfindungsgemäß ist es vorteilhaft, die Teilchen in destilliertem Wasser oder in einem wässrigen Medium mit Zusätzen wie Elektrolyten, Polyonen, Mono-, Di- und Polysacchariden, Isotonisierungsmitteln, Puffersubstanzen, zu dispergieren. Um den erfindungsgemäßen Zweck zu erreichen, kann ein Zusatz von einem oder mehreren dispersionsstabilisierenden Substanzen notwendig sein. Eine vorteilhafte Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass der Biomasse ein oder mehrere Wirkstoffe, Vitamine oder Nahrungsergänzungsstoffe in fester und/ oder flüssiger Form zugesetzt werden. Zweckmäßig ist es, die zugesetzten Wirkstoffe in den Fettsäuren der Biomasse zu suspendieren, zu dispergieren oder zu adsorbieren. Erfindungsgemäß wird die Biomasse in einem weiteren Herstellungsschritt mit einem Tensid- Wasser-Gemisch vereinigt. Zweckmäßig ist es, zunächst mit Hilfe eines Rührers (Rotor-Stator- Prinzip) oder mit Hilfe von Ultraschall eine Vorsuspension herzustellen. Erfindungsgemäß wird diese Vorsuspension danach mit Hilfe eines Hochdruckhomogenisators homogenisiert, wobei die Zahl der Homogenisationszyklen und der Arbeitsdruck nach der dem erfinderischen Zweck entsprechenden Partikelgröße und Stabilität der Zubereitung gewählt werden.

[0032] Bei einem anderen, ebenfalls erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren werden Biomasse und Wirkstoffe in einem verdampfbaren organischen Lösungsmittel suspendiert. Danach wird dieses Gemisch vordispergiert (Stator-Rotor-Prinzip oder Ultraschall) und homogenisiert (Hochdruckhomogenisator). Anschließend wird das Lösungsmittel durch Sprühtrocknung oder Gefriertrocknung oder mittels Rotationsverdampfer entfernt. Falls erforderlich, kann die Biomasse in geeigneten wässrigen Tensid-Lösungen redispersiert und danach nachdispergiert (Stator-Rotor-Prinzip oder Ultraschall) und anschließend homogenisiert (Hochdruckhomogenisator) werden. Falls erforderlich, kann ein Coemulgator bzw. ein Emulgator zur Dispergierung der Biomasse-Wirkstoffes-Mischung eingesetzt werden.

[0033] Die nach den beschriebenen Verfahren hergestellten Mikro und Nanopartikel ermöglichen eine Verwendung auf den verschiedensten Gebieten. Überraschenderweise zeigte sich eine deutlich bessere Bioverfügbarkeit der neuartigen Substanzen gegenüber den reinen Stoffen.

[0034] Die vorliegende Erfindung ermöglicht erstmals die Verwendung lipidhaltiger terrestrischer Pilze als Wirkstoffträger, z.B. für Antibiotika.

5 [0035] Die Erfindung erlaubt die Verwendung von Zusammensetzungen aus Biomassen lipidhaltiger Pilze in Kombination mit Thiocyanaten als gesundheitsfördernde Mittel sowie als Nahrungs-, Futtermittel, Nahrungsergänzungs- und Futterergänzungsmittel. Die Verwendung in diätischen Erzeugnissen ist ebenfalls möglich. Eine Kombination mit Arzneimitteln ist ebenfalls praktikabel. Eine Verwendung als nutritives Futtermittel ist gleichfalls möglich.

10 [0036] Weitere erfindungsgemäße Verwendungen sind die Verbesserung der Aufzuchtergebnisse sowie zur Prophylaxe und Therapie von Infektionskrankheiten in der Tierhaltung und Tierzucht.

15 [0037] Die Verwendung der gesundheitsfördernden Mittel kann in Form von Ölen, Sprays und/Salben sowie in Kapseln erfolgen.

[0038] Zahlreiche lipidhaltige Pilze enthalten Substanzen, die als unspezifische Immunstimulantien wirken können, d. h. sie stimulieren Leukozyten und wirken als Aktivatoren des retikuloendothelialen Systems. Nach der erfindungsgemäßen Umwandlung der Biomasse dieser
20 Organismen in Mikro- oder Nanopartikel ermöglichen diese Inhaltstoffe weitere Anwendungen. Vorteilhaft ist beispielsweise ein Einsatz in Abdeckmaterialien zur Wundversorgung. Erfindungsgemäß mit Antibiotika dotierte Mikro- und Nanopartikel erlauben eine gesteuerte Freisetzung der antimikrobiellen Wirkstoffe und eine gleichzeitige Immunstimulation. Vorteilhafterweise können diese Mikro- und Nanopartikel zusätzlich mit anorganischen Thiocyanaten oder Hydrothiocyanaten organischer Basen dotiert werden.
25

[0039] Die Erfindung ermöglicht den Einsatz zur gezielten Substituierung von Mangelzuständen. Besonders vorteilhaft ist die Verwendung der erfindungsgemäß hergestellten Produkte zur Immunstimulation sowie zur gezielten Substituierung des Thiocyanatmangels bei Dialyse-
30 patienten.

[0040] Besonders vorteilhaft ist, dass die Partikel mittels Rührwerken (Rotor-Stator-Prinzip) und Hochdruckhomogenisation hergestellt werden können, die seit Jahrzehnten zur Herstellung von Fettemulsionen zur parenteralen Ernährung genutzt und daher für eine Produktion
35 von Biomassepartikeln in industriellem Maßstab zur Verfügung stehen. Sie sind von den

staatlichen Behörden zur Herstellung von Parenteralia akzeptiert und bedürfen daher keiner neuen aufwendigen Zulassungsverfahren.

[0041] Die Merkmale der Erfindung gehen aus den Elementen der Ansprüche und aus der Beschreibung hervor, wobei sowohl einzelne Merkmale als auch mehrere in Form von Kombinationen vorteilhafte Ausführungen darstellen, für die mit dieser Schrift Schutz beantragt wird.

[0042] Das Wesen der Erfindung besteht aus einer Kombination aus bekannten (gesundheitsfördernde und heilende Wirkung bestimmter Pilze, gesundheitsfördernde Eigenschaften von Vitaminen und von Thiocyanaten) und neuen Elementen (Kultivierung in thiocyanathaltigen Nährlösungen, Umwandlung der Biomassen in Mikro- bzw. Nanopartikel mit Inkorporation von Vitaminen und anderen Wirkstoffen insbesondere der Thiocyanate), die sich gegenseitig beeinflussen und in ihrer neuen Gesamtwirkung einen Gebrauchsvorteil und den erstrebten Erfolg ergeben, der darin liegt, dass Wirkstoffträger bereitgestellt werden konnten, die die inkorporierten Wirkstoffe in besonderer Weise bioverfügbar machen.

[0043] Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen erläutert werden, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1 : Kultivierung verschiedener Pilze der Gattung Ganoderma mit und ohne Zusatz von Thiocyanat

[0044] Es wurde das Wachstum von G. pfeifferi, G. resinaceum, G. applanatum bzw. G. adspersum mit und ohne Thiocyanatzusatz vergleichend untersucht. Bei allen Pilzen wurden die gleichen Kulturbedingungen eingehalten.

[0045] Alle Schritte der Kultivierung wurden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Die Vorkultur wurde auf festem und später in flüssigem Hagem-Medium ausgeführt. Dafür wurden aus einem Schrägagarröhrchen mittels steriler Impföse kleine Stücke auf den Hagem-Agar überführt und ausgestrichen. Nach einer Wachstumszeit von ca. 3 Wochen bei natürlichem Tag-Nacht-Rhythmus wurden wiederum Stücke aus diesem Agar herausgestantzt, in sterile 100-ml-Erlmeyerkolben überführt und mit 50 ml Flüssig-Hagem-Medium pH 5,4 inkubiert. Die Standkultur konnte nach 2-3 Wochen für die folgenden Versuche verwendet werden.

Schüttelkultur und Fermenterkultur

[0046] Mit einem Homogenisator wurden die Kulturen von *G. pfeifferi*, *G. resinaceum*, *G. applanatum* bzw. *G. adpersum* möglichst fein homogenisiert und dann in einen sterilen 500-ml-Erlmeyerkolben überführt und mit Malzmedium pH 5,4 zu 300 ml aufgefüllt. Für einen Schüttelkulturansatz mit 10 Kolben wurden jeweils in sterile 500-ml-Kolben 10 ml Homogenisat mit Malzmedium zu 200 ml aufgefüllt. Die Kolben des Ansatzes wurden bei Raumtemperatur (20°C) bei natürlichen Lichtbedingungen kultiviert.

[0047] An den Tagen 6, 8, 12, 14, 15, 17, 20, 22 und 30 wurden jeweils 3 bis 5 Kolben geerntet. Nach der Bestimmung des pH-Wertes wurden Mycel und Medium durch Filtration voneinander getrennt. Das Mycel wurde in Kristallisierschalen überführt, lyophilisiert und anschließend das Trockengewicht bestimmt.

[0048] Um eine Fermenterkultur herzustellen, benötigte man die Mycelsuspension von 100 ml aufgefüllten Homogenisats, das in einen sterilen Fermenter eingebracht und mit Malzmedium auf 1000 ml aufgefüllt wurde. Dieser wurde ohne Luftzufuhr auf einer Magnetrührvorrichtung betrieben, so dass auch hierbei das Medium kontinuierlich durchmischt wurde. Die Kulturdauer betrug 6-18 Tage.

Kultivierung unter Zusatz von Thiocyanat

[0049] Dem Malzmedium wurde NaSCN in einer Konzentration von 1×10^{-3} mol/l zugesetzt. Durchführung der Kultur und Aufarbeitung der Produkte wie bei der Kontrolle.

Ergebnis

[0050] Eine Kultivierung in einem SCN⁻haltigem Medium ist möglich, das Wachstum wird positiv beeinflusst. Eine SCN⁻-Anreicherung in der Biomasse kann auf diese Weise gewährleistet werden.

Beispiel 2 : Extrakte, erhältlich aus dem Mycel der Spezies *Ganoderma pfeifferi* nach Anzucht in Fermentern

[0051] Methodik: Frisch geerntete junge Fruchtkörpern der Spezies *G. pfeifferi* wurden gereinigt und unter sterilen Bedingungen aufgebrochen. Aus dem Bereich des Übergangs vom Hut zum Stiel wurden mit einer sterilen Pinzette Gewebestücke entnommen und bei Zimmertem-

peratur auf Hagem-Agar kultiviert. Nachdem der Pilz sichtbares Wachstum zeigte, wurden einige Mycelstücke ausgestanzt und mit einem Hagem-Flüssigmedium im Bühler-Homogenisator (Edmund Bühler, Tübingen, G) zerkleinert. Anschließend erfolgte die weitere Kultur in 250 ml Erlenmeyer-Kolben mit Hagem-Flüssigmedium nach H. Kreisel und F. Schauer (Methoden des mykologischen Laboratoriums, Fischer-Verlag Jena 1987). Jeweils 100 ml Kulturmedium wurden mit 10 ml der wie oben beschreiben hergestellten Impfsuspension versetzt. Die Kultivierung erfolgte bei Raumtemperatur und konstanten Lichtverhältnissen für 30 Tage, wobei eine kontinuierliche Durchmischung mittels einer Schüttelmaschine (Innova 2100, New Brunswick Scientific Co, INC. EDISON, New Jersey, USA) mit einer Geschwindigkeit von 125 U/min erreicht wurde. Die weitere Maßstabsvergrößerung erfolgte durch Überführung in einen Bioreaktor von 10 l Volumen. Der Fermenter wurde mit 6 l autoklaviertem HAGEM-Medium (flüssig) versetzt. Dieses wurde mit 60 ml Impfsuspension versetzt. Die Kultivierung im Fermenter erfolgte bei Raumtemperatur unter ständiger Begasung mit steriler Luft, kontinuierlichem Rühren und im Tag-Nacht-Rhythmus.

[0052] Zur Bestimmung des Myceltrockengewichtes wurde das Mycel durch Filtration vom Medium getrennt, in tarierte Kristallisierschalen überführt, analog Beispiel 2 lyophilisiert und das Trockengewicht auf einer Feinwaage (Sartorius, Göttingen, G) ermittelt. Die getrockneten Mycele wurden in Extraktionshülsen gefüllt und mit Dichlormethan (E. Merck, Darmstadt) in einer Soxhlet-Apparatur 24 h extrahiert. Der Mycelrückstand wurde nach Verdunsten von Dichlormethan-Resten 3mal je 2 h mit 80%igem Ethanol (E. Merck, Darmstadt) unter ständigem Schütteln bei Raumtemperatur extrahiert. Der Mycelrückstand wurde mit einem Büchnertrichter abgetrennt und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser 3mal je 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt, die Abtrennung des Pilzrückstandes erfolgte wiederum mittels Büchner-Trichter. Der Rückstand des kaltwässrigen Extraktes wurde 3mal mit destilliertem Wasser bei 70°C extrahiert und anschließend filtriert.

[0053] Alle Extrakte wurden im Vakuumrotationsverdampfer (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz) bei 40°C eingeeengt und anschließend lyophilisiert (Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, G).

[0054] Ergebnis: Die Kultivierung von *G. pfeifferi* ist mit Flüssig-Medium möglich.

[0055] Die Ausbeute beträgt durchschnittlich 5 g Mycel/l.

[0056] Eine Kultivierung im 10 l-Fermenter erlaubt die Gewinnung von Mycel in größeren Mengen.

Beispiel 3

[0057] Methodik: Durchführung der Versuche nach Beispiel 2, aber unter Zusatz von 0,1-1% Kaliumthiocyanat.

[0058] Ergebnis: Steigerung der Ausbeute an Mycel von 0,34 + 0,0568 g /100 ml auf 0,691 + 0,048 g/100 ml durch Zusatz von 0,5% Kaliumthiocyanat.

5

Beispiel 4: Extrakte, erhalten durch eine Extraktion des Fruchtkörpers oder des Mycels mit einem lipophilen Lösungsmittel

[0059] Methodik: Lyophilisiertes Mycel wurde in Extraktionshülsen gefüllt und mit verschiedenen lipophilen Lösungsmittel in einer Soxhlet-Apparatur für 24 h extrahiert. Alle Extrakte wurden im Vakuumrotationsverdampfer (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz) bei 40°C eingengt, lyophilisiert (Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, G) und anschließend das Trockengewicht ermittelt.

[0060] Ergebnis: Dichlormethan ist am besten geeignet, um eine hohe Ausbeute biologisch aktiver Extrakte zu erhalten.

15

Beispiel 5 : Extrakte, erhalten durch eine Extraktion des Kulturmediums mit Ethylacetat

[0061] Methodik: Das Medium der Pilzkultur wurde im Vakuumrotationsverdampfer (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz) auf ca. 50 ml eingengt und anschließend durch mehrfaches Schütteln mit Ethylacetat extrahiert. Der Vorgang wurde wiederholt, bis die Ethylacetatphase keine Färbung aufwies.

[0062] Ergebnis: Es wurden Ausbeuten zwischen 0,1 und 0,5% erhalten. Die Extrakte, gewonnen aus Pilzkulturen ohne SCN-Zusatz zeigten im Agardiffusionstest eine Hemmwirkung gegen S. aureus mit Hemmhöfen bis 18 und 20 mm, solche aus Pilzkulturen mit SCN-Zusatz von 23 und 20 mm.

25

Tab. 1 Hemmwirkung gegen S. aureus

Testkeim	Hemmhof (mm) (Kulturen ohne SCN)	Hemmhof (mm) (Kulturen mit SCN)
S. aureus	18	23
M. flavus	20	20

Beispiel 6 : Extraktion von Kulturmycel mit Wasser

[0063] Methodik: Kulturmycel nach Beispiel 2 und 3 wurden mit Wasser von 70°C, in einem weiteren Versuch zunächst mit Wasser von 20°C und anschließend mit Wasser von 70°C extrahiert.

[0064] Ergebnisse: Es werden Extrakte erhalten, die etwa 6% der Mycelgesamtmasse ausmachen. Eine Auftrennung der Extrakte wird erreicht, wenn die Extraktion stufenweise durchgeführt wird

Tab. 2 Ausbeuten wässriger Extrakte und Anteil an der Gesamtmasse des. des Mycels

Ausgangsstoff/Bedingungen	Ausbeute des Extrakts (mg)	Anteil an der Gesamtmycel- masse (%)
Mycel aus Beispiel 3, 70°C	45	7,5
Mycel aus Beispiel 2, 70°C	42	7,0
Mycel aus Beispiel 3, 20°C	27	4,5
Mycel aus Beispiel 2, 20°C	28	4,7
Mycel aus Beispiel 3, erst 20°C, dann 70°C	19	3,2
Mycel aus Beispiel 2, erst 20°C, dann 70°C	14	2,4

Beispiel 7 : Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln aus Mycel von Shii-take -Pilzen

Es wurden Shii-take (Lentinula edodes) eingesetzt

Tabelle 3: Rezeptur der – Shii-take— Mikro- und Nanopartikeln

Stoff	Menge in g
Biomasse	5,00
Emulgator (Pluronic F68)	0,05
Demineralisiertes Wasser	45,00
Homogenisationszyklen	4

[0065] Die Biomasse wird auf eine Temperatur von 50°C erwärmt. Davon getrennt wird eine wässrige Emulgatorlösung auf die entsprechende Temperatur (50°C) erwärmt. Danach werden beide Phasen bei der gewünschten Homogenisierungstemperatur vereint. Dann wird das Gemisch mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland) in einem Emulgierungsprozess bei 8000 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 30 Sekunden verarbeitet. Die Suspension wird danach mit einem Kolbenspalt-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 (APV-Gaulin, Lübeck) bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 50°C vier mal homogenisiert.

Beispiel 8 : Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln aus Mycel Shii-take (Lentinula edodes) –Vitamin C-Kombinationen

[0066] Es wurde das Mycel des Pilzes Shii-take (Lentinula edodes) eingesetzt.

Tabelle 4: Rezeptur der Shii-take (Lentinula edodes) - Mikro- und Nanopartikeln

Stoff	Menge in g
Biomasse	5,00
Emulgator (Pluronic F68)	0,05
Demineralisiertes Wasser	45,00
Vitamin C	5
Homogenisationszyklen	4

[0067] Anschließend wurden in die Biomasse 5 g Vitamin C eingearbeitet. Davon getrennt wird eine wässrige Emulgatorlösung auf die entsprechende Temperatur (50°C) erwärmt. Danach werden beide Phasen bei der gewünschten Homogenisierungstemperatur vereint. Das Gemisch wird mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland) in einem Emulgierungsprozess bei 8000 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 30 Sekunden verarbeitet. Die Suspension wird danach mit einem Kolbenspalt-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 (APV-Gaulin, Lübeck) bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 50°C vier mal homogenisiert.

[0068] Die beiden Mikro- und Nanopartikeln B30 und Vitamin C wurden miteinander gemischt.

Beispiel 9 Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln aus dem Fruchtkörper des Pilzes Judasohr (Auricularia auricula-judae)

[0069] Es wurden Fruchtkörper des Judasohr-Pilzes eingesetzt.

[0070] Die Biomasse wird bei einer Temperatur von 25°C in eine wässrige Emulgatorlösung dispergiert. Anschließend wird das Gemisch mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland) in einem Emulgierungsprozess bei 8000 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 30 Sekunden verarbeitet. Die Suspension wird danach mit einem Kolbenspalt - Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 (APV-Gaulin, Lübeck) bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 50°C vier mal homogenisiert.

Tabelle 5: Rezeptur des Judasohr (*Auricularia auricula-judae*) -Pilzes – Mikro-und Nanopartikeln

Stoff	Menge in g
Biomasse	5,00
Emulgator (Plantacare 2000)	0,05
Demineralisiertes Wasser	45,00
Homogenisationszyklen	4

Beispiel 10 :Herstellung von Mikro-und Nanopartikeln aus dem Fruchtkörper des Pilzes *Ganoderma lucidum* – (Glänzender Lackporling)

[0071] Es wurden Fruchtkörper der *Ganoderma lucidum* -Pilze eingesetzt.

Tabelle 6: Rezeptur der *Ganoderma lucidum* -Pilze – Partikel

Stoff	Menge in g
Biomasse	5,00
Emulgator (Plantacare 2000)	0,05
Demineralisiertes Wasser	45,00
Homogenisationszyklen	4

[0072] Die Biomasse wird bei einer Temperatur von 25°C in eine wässrige Emulgatorlösung dispergiert. Anschließend wird das Gemisch mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland) in einem Emulgierungsprozess bei 8000 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 30 Sekunden verarbeitet. Die Suspension wird

danach mit einem Kolbenspalt-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 (APV-Gaulin, Lübeck) bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 50°C viermal homogenisiert.

Beispiel 11 : Herstellung von Mikro-und nanopartikeln aus Mycel des Pilzes Maitake(Grifola frondosa)

[0073] Das Mycel des Pilzes Maitakev(Grifola frondosa) wurde zu Mikro-und nanopartikeln verarbeitet.

[0074] Die Biomasse wird bei einer Temperatur von 25°C in eine wässrige Emulgatorlösung dispergiert. Anschließend wird das Gemisch mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland) in einem Emulgierungsprozess bei 8000 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 30 Sekunden verarbeitet. Die Suspension wird danach mit einem Kolbenspalt-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 (APV-Gaulin, Lübeck) bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 50°C viermal homogenisiert.

Tabelle 7: Rezeptur der Nostocales – Mikro- und Nanopartikeln

Stoff	Menge in g
Biomasse	5,00
Emulgator (Plantacare 2000)	0,05
Demineralisiertes Wasser	45,00
Homogenisationszyklen	4

Beispiel 12 : Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln aus Fruchtkörpern des Maitake(Grifola frondosa) mit Vitamin C nach dem Lösungsmittelverfahren

[0075] Es wurden Fruchtkörper des Maitake(Grifola frondosa)-Pilzes eingesetzt.

Tabelle 8: (Lösungsmittelverfahren)

Wasser	45,00 g gereinigtes, filtrierte Wasser
organisches Lösungsmittel	25 ml n-Hexan
Biomasse	0,5 g Maitake(Grifola frondosa)
Vitamin	5 g Vitamin C
Tensid	0,5 g Plantacare

[0076] Zunächst wird die Biomasse in n-Hexan gelöst, wobei die Lipide aus der Biomasse gelöst werden. Die Biomasse wird ca. 3 Stunden in dem Lösungsmittel gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel mittels eines Rotationsverdampfer abgezogen. Dabei bildet sich eine Lipidschicht an der Kolbenoberfläche. Zur Redispergierung wird eine Vitamin C- haltige Lösung benötigt: Vitamin C wird in eine Plantacare-Lösung gebacht und nach einem 90 sekunden Dispergiervorgang viermal homogenisiert. Die entstehende Vitamin C-haltige Lösung wird in den Kolben mit der Lipidschicht gebracht. Die Lipidschicht löst sich bei der anschließenden Rotation des Kolbens und bildet dadurch verkapselte Mikro- und Nanopartikeln. Die Rotation dauert zirka 10 Stunden bei einer Temperatur von 40 ° C.

Beispiel 13 : Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln aus Fruchtkörper des Pilzes Maitake - Norlichexanthon

15 Tabelle 9: Rezeptur der Biomasse- Norlichexanthon- Mikro- und Nanopartikeln

Stoff	Menge in g
Wirkstoff (Norlichexanthon)	0,05
Biomasse - Maitake(Grifola frondosa)	5,00
Emulgator (Pluronic F 68)	0,05
Demineralisiertes Wasser	45,00
Homogenisationszyklen	4

[0077] Die Biomasse wird auf eine Temperatur von 50°C erwärmt und anschließend der verwendete marine Wirkstoff Norlichexanthon darin dispergiert bzw. gelöst. Davon getrennt wird eine wässrige Emulgatorlösung auf die entsprechende Temperatur (50°C) erwärmt. Danach werden beide Phasen bei der gewünschten Homogenisierungstemperatur vereint. Anschließend wird das Gemisch mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland) in einem Emulgierungsprozess bei 8000 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 30 Sekunden verarbeitet. Die Suspension wird danach mit einem Kolbenspalt-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 (APV-Gaulin, Lübeck) bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 50°C viermal homogenisiert.

Beispiel 14 : Herstellung Mikro- und Nanopartikeln aus Fruchtkörper des Pilzes Maitake - Vitamin E

[0078] In die Biomasse wird das Vitamin E dispergiert. Davon getrennt wird eine wässrige Emulgatorlösung hergestellt. Anschließend wird das Gemisch mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland) in einem Emulgierungsprozess bei 8000 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 30 Sekunden verarbeitet. Die Suspension wird danach mit einem Kolbenspalt-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 (APV-Gaulin, Lübeck) bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 50°C vier mal homogenisiert.

10 Tabelle 10: Rezeptur der Biomasse- Vitamin E– Mikro- und Nanopartikeln

Stoff	Menge in g
Wirkstoff Vitamin E	0,05
Biomasse -Maitake(<i>Grifola frondosa</i>)	5,00
Emulgator (Plantacare 2000)	0,05
Demineralisiertes Wasser	45,00
Homogenisationszyklen	4

Beispiel 15 :Herstellung Mikro- und Nanopartikeln aus Fruchtkörper des Pilzes Maitake(*Grifola frondosa*)- Provitamin Q10

15 Tabelle 11 Rezeptur der Biomasse-Provitamin Q10– Mikro- und Nanopartikeln

Stoff	Menge in g
Wirkstoff Provitamin Q10	0,05
Biomasse Maitake(<i>Grifola frondosa</i>)	5,00
Emulgator (Plantacare 2000)	0,05
Demineralisiertes Wasser	45,00
Homogenisationszyklen	4

[0079] In die Biomasse wird das Provitamin Q10_dispergiert. Davon getrennt wird eine wässrige Emulgatorlösung hergestellt. Anschließend wird das Gemisch mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland) in einem Emulgierungsprozess bei 8000 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 30 Sekunden verarbeitet. Die Suspension wird danach mit einem Kolbenspalt-Hochdruckhomogenisator Micron

Lab 40 (APV-Gaulin, Lübeck) bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 50°C viermal homogenisiert.

Beispiel 16 :Testung von Mikro- und Nanopartikeln aus Mycel von Shii-take-Pilzen /Vitamin C hergestellt nach Beispiel 7 und 8 am Tiermodell (Kuheuterzitze)

[0080] Die beiden Substanzen wurden 1:1 miteinander gemischt.

Methodik:

[0081] 1 Stunde nach Tötung der Kuh wurden die Euterzitzen verarbeitet. Die Zitzen wurden von der Fettschicht befreit. Danach wurden die Zitzen auf Metallstäbe entsprechender Größe gesteckt und mit Schellen befestigt. Die Zitzen wurden mit 70%igem Alkohol abgerieben. 20 µl Testsubstanz wurde aufpipettiert und mit einem Glasspatel verrieben, und bei Raumtemperatur 30-45 Minuten getrocknet. Die Kontamination erfolgte mit 10 µl des Norddeutschen Stammes, MF 0,5 1:10 verdünnt. Nach Bebrütung bei 30°C für 1,5 Stunden wurden die Hautareale auf Müller-Hinton Platten ausgestrichen und bei 37°C inkubiert.

[0082] Bei den Kontrollen wurden ausschließlich Keimzahlen > 100 gefunden. Daraus wurden die mittlere Keimzahl n und die Streuung berechnet.

[0083] Bei der Untersuchung der Zubereitungen wurden Keimzahlen zwischen 0 und 100 gefunden. Daraus wurde die mittlere Keimzahl m auf der Basis der Poisson-Verteilung nach folgender Formel berechnet: $m = \ln (\text{Zahl der Proben ohne Keimnachweis}/\text{Gesamtzahl der Proben})$.

[0084] Statistische Auswertung: Die Anzahl der Hautareale mit und ohne Keimnachweis für die Kontrolle ohne Behandlung und nach Behandlung mit dem Testprodukt wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Testes auf Signifikanz geprüft.

Ergebnisse

[0085] Die Testung der Mikro- und Nanopartikeln, herstellt nach Beispiel 8 bewirkte am Hautmodell (Kuheuterzitze) eine ausgeprägte Reduktion der übertragenen Kontamination mit MRSA. Die Zahl der Wiederholungen am Kuheuterzitze betrug für die unbehandelten Kontrollen 163. Bei allen 163 Proben war S. aureus nachweisbar. Die mittlere Keimzahl ... Auch bei allen Proben, die mit Wollwachsalkoholsalbe behandelt waren, wurde S. aureus nachgewiesen. Nach Anwendung des Testproduktes waren 11 Hautareale mit Keimnachweis und 11 ohne Keimnachweis. Daraus errechnet sich eine im Mittel zu erwartende Keimzahl von 0,7 (Abb. 5). Die Keimzahlreduktion ist hoch signifikant.

Beispiel 17 : Testung von Mikro- und Nanopartikeln aus Mycel von Shii-take-Pilzen /Vitamin C“ hergestellt nach Beispiel 7 und 8 am Tiermodell Mäuseohr

5 **Methodik**

[0086] Als Testmodell wurden Mäuseohren verwendet. Die Donator-Tiere als Infektionsquelle blieben unbehandelt. Akzeptortiere wurde 3 Tage einmal täglich mit „Shii-take-Pilze /Vitamin C“ hergestellt nach Beispiel 8 behandelt.

10 [0087] Dazu wurden 10 µl Testsubstanz wurde aufpipettiert und mit einem Glasspatel verrieben, und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Tiere wurden nach vier Tagen getötet. Die Kontamination der Donatortiere erfolgte mit 5 µl des Norddeutschen Stammes, MF 0,5 1:10 verdünnt. Dazu wurde ein unbehandeltes Ohr kontaminiert und danach 90 Minuten bei 30 °C bebrütet. Die mit Biomasse behandelten Ohren wurden auf entsprechende Stempel aufgezogen. Mit Druck wurden die kontaminierten Ohren auf die auf die unbehandelten Ohren 15 Sekunden gepresst.

[0088] Nach Bebrütung bei 30°C für 1,5 Stunden wurden die Hautareale der Akzeptor-Ohren auf Müller- Hinton Platten ausgestrichen und bei 37°C inkubiert.

[0089] Auswertung: Die Auswertung und statistische Sicherung erfolgte wie im Beispiel 9 beschrieben.

20

Ergebnisse:

[0090] Die Testung der Mikro- und Nanopartikeln, hergestellt nach Beispiel 7 und 8, zeigte auch im Donator-Akzeptor-Versuch, mit dem die Infektionsübertragung mittels Hautkontakt simuliert wurde , eine signifikante Reduktion der übertragenen Keime.

25

[0091] Die Zahl der Wiederholungen am Mäuseohr betrug für die unbehandelten Kontrollen 163, dabei wurde auf Hautarealen Keimwachstum nachgewiesen. Bei Vorbehandlung mit der Zubereitung nach Beispiel 7 und 8 wurden 12 Hautareale mit und 5 ohne Keimnachweis. Daraus ergibt sich, dass nach einer entsprechenden Vorbehandlung im Mittel nur noch 1,2 Keime/cm² zu erwarten sind (Abb. 6).

30

Beispiel 18 :Testung von Mikro- und Nanopartikeln „Mycel von Shii-take-Pilzen /Vitamin C“ hergestellt nach Beispiel 7 und 8 am Hängebauchschwein

[0092] Methodik: Für die Testung stand ein Hängebauchschwein zur Verfügung. 2 Stunden nach Tötung des Tieres wurde von den Bauchunterseiten, in Nähe der Zitzen Haut herausgeschnitten, die Fettschicht weitestgehend entfernt und in Stücke geschnitten. Diese wurde auf Vorrichtungen gespannt, so dass ca. 1cm² zur Bearbeitung zur Verfügung stand. Diese Haut-

5 flächen wurden rasiert bzw. die Borsten mit der Schere abgeschnitten und anschließend 2 x mit 70% Ethanol abgerieben. 20 µl Testsubstanz wurden aufgebracht und 45 min inkubiert. Die Kontamination erfolgte mit 10 µl des Norddeutschen Stammes, MF 0,5 1:10 verdünnt. Nach Bebrütung bei 30°C für 1,5 Stunden wurden die Hautareale auf Müller Hinton Platten ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Nach der Bebrütung erfolgte die Auszählung der Kei-

10 me.

Ergebnis

[0093] Trotz der vorgenommenen Hautdesinfektion waren auf dem Abstrich zahlreiche koagulasenegative apathogene Staphylokokken der normalen Hautflora des Schweins nachweis-

15 bar. Die koagulase positiven aureus-Stämme, mit denen die Kontamination vorgenommen worden war, waren bei der unbehandelten Kontrolle zahlreich neben S. epidermidis nachweisbar, bei der erfindungsgemäß behandelten Tieren waren alle untersuchten Kolonien koagulase negativ.

20 **Beispiel 19** : Testung von Mikro- und Nanopartikeln aus Mycel von Shii-take-Pilz /Vitamin C hergestellt nach Beispiel 8 am Hautmodell nach Beispiel 17

Ergebnis

[0094] Die Zahl der Wiederholungen an der Kuheuterzitze betrug für die unbehandelten

25 Kontrollen 158. Die Zahl der Hautareale mit Keimnachweis betrug nach Anwendung der Mikro- und Nanopartikel 2 und ohne Keimnachweis 4. Das bedeutet, dass nach Behandlung mit der erfindungsgemäßen Zubereitung nach Beispiel 8 im Mittel nur noch 0,4 Keime/cm² zu erwarten sind. Die Keimzahlreduktion ist im Chi-Quadrat-Test hoch signifikant.

30 **Beispiel 20** : Testung von Mikro- und Nanopartikeln aus dem Fruchtkörper von Maitake (Gri-fola frondosa)/ Vitamin C“ hergestellt nach Beispiel 12 am Hautmodell nach Beispiel 17

Ergebnisse:

[0095] Die Testung der Mikro- und Nanopartikeln, hergestellt nach Beispiel 12, zeigte im Donator-Akzeptor-Versuch, mit dem die Infektionsübertragung mittels Hautkontakt simuliert wurde, eine signifikante Reduktion der übertragenen Keime. Die Zahl der Hautareale mit Keimnachweis betrug 1 und ohne Keimnachweis 5. Daraus ergibt sich, dass nach der erfindungsgemäßen Vorbehandlung im Mittel nur noch 0,18 Keime beobachtet werden. Die Reduktion der übertragenen Keime ist im Chi-Quadrat-Test hoch signifikant.

Beispiel 21 : Prüfung von Mikro- und Nanopartikeln, hergestellt nach den Beispielen am Hautmodell nach Beispiel 9

Ergebnisse

[0096] Die Mikro- und Nanopartikeln Norlichexathon-Vitamin E-Q10 (Lösungsmittelverfahren) wurden nach Beispiel 13,14,15 hergestellt und im Verhältnis 1 : 1 : 1 gemischt. Die Testung erfolgte nach dem in Beispiel 16 dargestellten Verfahren.

Ergebnis

[0097] Die Anzahl der getesteten Zubereitungen mit der Norlichexanthon betrug 22. Die Zahl der Hautareale mit Keimnachweis betrug 19 und ohne Keimnachweis 3. Im Mittel sind nach Vorbehandlung mit erfindungsgemäßen Zubereitungen nach Beispiel 14 noch 2 Keime zu erwarten.

Beispiel 22 : Herstellung von Ubichinon Q1 –Biomasse - Partikeln

[0098] Die Biomasse (Maitake) wird auf eine Temperatur von 50 °C erwärmt und anschließend Ubichinon Q1 darin dispergiert bzw. gelöst. Davon getrennt wird eine wässrige Emulgatorlösung auf die entsprechende Temperatur (50 °C) erwärmt. Danach werden beide Phasen bei der gewünschten Homogenisierungstemperatur vereint. Anschließend wird das Gemisch mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland) in einem Emulgierungsprozess bei 8000 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 30 Sekunden verarbeitet.

[0099] Die Suspension wird danach mit einem Kolbenspalt-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 (APV-Gaulin, Lübeck) bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 50 °C vier mal homogenisiert.

Tab. 12 Rezeptur der Ubichinon – Biomasse - Partikeln

Stoff	Menge in g
Wirkstoff (Ubichinon Q1)	0,05
Maitake(Grifola frondosa)	5,00
Emulgator (Plantacare 2000)	0,05
Demineralisiertes Wasser	45,00
Homogenisationszyklen	4

Beispiel 23 : Verhinderung der Übertragung von MRSA bei Hautkontakten mit der Zubereitung nach Beispiel 22

Methodik

[0100] Für die Versuche wurden Schwänze von Mäusen aus keimfreier Haltung verwendet. Um jede Fremdkontamination auszuschließen, wurde sie vor Versuchsbeginn für 5 min in 70 %igen Alkohol eingelegt und danach unter der Laminarbox getrocknet.

[0101] Die Donatormäuseschwänze als Infektionsquelle wurden durch Einlegen (30 s bis 4 min) in eine verdünnte MRSA.Kultur (Norddeutscher Stamm, MF-Standard 0,5 bzw. 0,3) kontaminiert und danach 24 h bei 37 °C bebrütet. Bei Abstrichen von diesen Donatoren wurden Keimzahlen > 100.000 nachgewiesen.

[0102] In die Mäuseschwänze, die den empfänglichen Organismus simulieren (Akzeptoren) wurden die Versuchssubstanzen zweimal täglich einmassiert.

[0103] Die Infektionsübertragung vom Donator zum Akzeptor erfolgte durch Hautkontakt mit den Donatoren für 30 s bis 1 min auf der Schüttelmaschine bei 600 U/min. 2 h bzw. 24 h nach der Kontamination wurden die Donatoren auf Blut-Müller-Hinton-Agarplatten ausgestrichen. Nach 24 h Bebrütung der Agarplatten bei 37 °C wurden die Kolonien ausgezählt.

Ergebnisse:

[0104] Beim Ausstreichen der Akzeptoren unmittelbar nach dem Hautkontakt sind die Platten vollständig bewachsen (Keimzahl > 10 000). Das gilt gleicherweise für vorbehandelte wie für

Kontrollen ohne Vorbehandlung. Das bedeutet, dass eine massive Übertragung der MRSA in diesem Modell gut simuliert werden kann. Bei Versuchs- und Kontrollgruppe wird die gleiche Keimzahl übertragen.

[0105] 2 h bzw. 24 h sind dagegen nur noch geringen Keimzahlen bei den vorbehandelten Akzeptoren nachzuweisen, während die Keimzahlen bei den unbehandelten Kontrollen unverändert hoch sind. (Tab. 1). Auch mit diesem Versuchsmodell kann also die Unterbrechung der Infektionswege durch eine Vorbehandlung mit den erfindungsgemäßen Formulierungen nachgewiesen werden.

10 Tab. 13 Keimzahlen auf Mäuseschwänzen (Akzeptoren) in Abhängigkeit von der Vorbehandlung nach Kontakt mit mit MRSA kolonisierten Mäuseschwänzen (Donatoren).

Donator		Hautkontakt (min)	Vorbehandlung des Akzeptors	Keimzahl des Akzeptors	
McFarland- Standard	Kontamination (min)			2 h	24 h
0,5	5	0,5 1	ohne	>10000 > 10000	>10000 > 10000
0,5	5	0,5 1	2 d Zubereitung nach Beispiel 15	143	2
				80	36
0,5	3	0,5	ohne	>10000	>10000
			2 d Zubereitung nach Beispiel 15		6
0,3	1	1	ohne		> 10000
			2 d Zubereitung nach Beispiel 15		2

[0106] Diese Tests wurden mit weiteren Vitaminen und antioxidativen Wirkstoffen durchgeführt. Sowohl am Mäuseohr tiermodell als auch am Kuheuterzitzenmodell konnten Reduktionen im Fall der Kombination Norlichexanthon und Provitamin Q10 beobachtet werden. Die stärkste Keimminderung von Anflugkeimen gelang jedoch bei der Kombination Vitamin E, Norlichexanthon und Provitamin Q10.

Beispiel 24 Teilchengrößenbestimmung der Mikro-und nanopartikeln, hergestellt nach Beispiel 8

Methodik

- 5 [0107] Die Teilchengröße durch Photonenkorrelationsspektroskopie wurde mit Hilfe eines Zetasizer III (Malvern, UK) bestimmt.

Beispiel 25 :Nachweis der Radikalfängereigenschaft der Extrakte mittels Chemilumineszenz

- 10 [0108] Der Nachweis wurde wie folgt geführt:

[0109] A: 30 ml humanes Blut wurden mit 170 ml PBS + Luminol (0,33 mM final) 20 min bei 37°C vorinkubiert.

[0110] B: 30 µl humanes Blut wurden mit 170 ml PBS + Luminol (0,33 mM final) und 20 ml Substanzverdünnung 20 min bei 37°C vorinkubiert.

- 15 [0111] Zu A wurden je 20 µl eine 1:100 Verdünnung des Extraktes nach Beispiel B und C und 20 µl Zymosan (10 mg/ml) pipettiert.

[0112] Zu B wurden 20 µl Zymosan (10 mg/ml) pipettiert.

- [0113] Als Kontrolle verwendeten wir PBS statt Zymosan als Stimulator mit und ohne Substanz in den Ansätzen A und B. Nach intensivem Mischen wurde die Kinetik der Lumineszenz über 60 min gemessen. Die Untersuchungen erfolgten an zwei unterschiedlichen Tagen mit Blut von zwei verschiedenen Blutspendern.

20 [0114] Ergebnis: Die Extrakte hemmen eindeutig die durch Luminol induzierte und die spontane Sauerstoffradikalfreisetzung oder fangen die freigesetzten Radikale ab. Durch den Thiocyanatzusatz wird dieser Effekt verstärkt.

- 25 **Beispiel 26** :Testung der Radikalfängereigenschaften von Pilzen mit Hilfe des α , α -Diphenyl- β -picrylhydrazyl radical scavening effect (DPPH-Assay)

- 30 [0115] Zur Testung der Radikalfängereigenschaften der Pilz/Vitamin-Kombinationen wurde der DPPH-Assay verwendet.

Prinzip

[0116] Das DPPH-Radikal (2,2Diphenyl-1-picrylhydrazyl) hat sein Absorptionsmaximum bei 517 nm und eine violette Färbung, die auf das ungepaarte Elektron am Stickstoffatom zurückzuführen ist. Die Farbe ändert sich von violett zu gelb, wenn das Radikal eine Bindung mit einem Wasserstoffatom eines Radikalfängers eingeht und das reduzierte DPPH-H(2,2-Diphenyl-β-picrylhydrazyl) entsteht. Dabei verringert sich auch die Absorption was mit einem Photometer messbar ist.

Methode

[0117] Die Vergleichssubstanz wird in Ethanol gelöst und folgende Verdünnungen hergestellt: 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100µg/ml, 500 µg/ml.

[0118] 1mM DPPH in Ethanol gelöst entspricht 294µg/ml. 4 mg der Pilz/Vitamin-Kombinationen werden in 4 ml Ethanol gelöst und folgende Verdünnung wird hergestellt: 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100µg/ml, 500 µg/ml.

Versuchsablauf:

[0119] 500µl der Probe werden in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Dazu wird 375µl Ethanol und 125 µl DPPH-Lösung gegeben. Die Lösung wird geschüttelt und 30 min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Nach dieser Zeit wird die Absorption bei 517 nm im Photometer gemessen. Die gemessenen Absorptionen werden dann in % Radikalfängeraktivität im Vergleich zum Leerwert (875 µg/ml Ethanol + 125 µg/ml DPPH ausgedrückt.

$$\text{Menge in \%} = 100 - \left[A_{\text{sample}} \times \frac{100}{A_{\text{control}}} \right]$$

Tab. 14 Ergebnis *Auricularia auricula-judae* – Judasohr-Mycel / Ascorbinsäure

Menge in µg/ml	Absorbtion des Pilzes/ Ascorbinsäure	Menge in %
10	0,854	40,26
50	0,6532	53,82
100	0,323	70,42
500	0,0558	96,05
1000	0,0558	96,05

Tab. 15 Ergebnis *Ganoderma lucidum* – Glänzender Lackporling-Mycel/ Ascorbinsäure

Menge in µg/ml	Absorbtion des Pilzes/ Ascorbinsäure	Menge in %
10	1,0516	26,54
50	0,9956	29,61
100	0,7504	47,58

500	0,11	91,67
1000	0,0834	94,17

Tab. 16 Ergebnis *Grifola frondosa* – Maitake-Mycel/ Ascorbinsäure

Menge in µg/ml	Absorbtion des Pilzes/ Ascorbinsäure	Menge in %
10	2,2476	11,88
50	0,0457	98,21
100	0,0365	98,57
500	0,0355	98,61
1000	0,0413	98,38

5

Tab. 17 Ergebnis *Heridium erinaceus* – Igelstachelbart-Mycel/ Ascorbinsäure

Menge in µg/ml	Absorbtion des Pilzes/ Ascorbinsäure	Menge in %
10	0,3933	74,14
50	0,0342	97,75
100	0,0316	97,92
500	0,0385	97,47
1000	0,0456	97

10

Tab. 18 Ergebnis *Lentinula edodes* – Shii-take-Mycel/ Ascorbinsäure

Menge in µg/ml	Absorbtion des Pilzes/ Ascorbinsäure	Menge in %
10	0,9145	51,69
50	0,016	99,91
100	0,005	99,97
500	0,0063	99,67
1000	0,0029	99,85

15 **Beispiel 27 : Hemmung der neutralen Endopeptidase**

[0120] Methodik: Der Nachweis der spezifischen Hemmung der neutralen Endopeptidase erfolgte nach Melzig et. al., Pharmazie 51 (1996) 501-503.

20 **[0121] Ergebnis:** Durch den Extrakt des Mycels nach Beispiel B mit 80%igem Alkohol wird bei einer Konzentration von 100 µg/ml eine Hemmung um 68%, bei 200 µg/ml um 84% erreicht.

[0122] Bei dem entsprechenden ethanologischen Extrakt des Kulturmycels mit SCN-Zusatz nach Beispiel C wurde die Aktivität des Enzyms schon bei einer Konzentration von 50 µg/ml um 70% gehemmt.

[0123] Die wässrigen Extrakte aus dem Mycel sind ebenfalls wirksam. Nach Inkubation mit 50 µg/ml des kaltwässrigen Extraktes wurde eine Hemmung der Enzymaktivität um 65% gefunden. Ein Einfluss des SCN⁻ war nicht zu erkennen.

Beispiel 28 : Verwendung der Extrakte zur Hemmung der Aktivität von Proteasen

[0124] Proteasen sind an zahlreichen posttranslationalen Prozessen der Funktionsregulation des Makroorganismus beteiligt. Bei einer Hemmung der Proteasen sind vielfältige pharmakologische Wirkungen zu erwarten. Der Nachweis einer Enzyminhibition durch wässrige und ethanoloische Extrakte gemäß Beispiel 2 und 3 erfolgte am Beispiel des Angiotensin-Konverting-Enzyms nach Melzig et al., Pharmazie 51 (1996), 501-503.

[0125] Ergebnis: Die wässrigen und alkoholischen Extrakte weisen in Konzentrationen von 100-200 µg/ml eine Hemmung des Angiotensin-Konverting Enzyms auf.

Beispiel 29 : Anwendung als vor freien Radikalen schützender vitalisierender und keimmindernder Zusatzstoff für pharmazeutische Zubereitungen

[0126] Der Zusatz der Extrakte verhindert oxidative Zersetzungen, wirkt auf Grund seiner antibakteriellen Eigenschaften konservierend und bewirkt aufgrund seiner Radikalfängereigenschaften einen Schutz vor hautschädigenden Radikalbildnern.

[0127] Darüber hinaus wirken die Ganoderma-Extrakte entzündungshemmend. Die Kombination dieser Eigenschaften bietet gute Voraussetzungen für eine Anwendung als Zusatzstoff für pharmazeutische Zubereitungen.

Beispiel 30 : Verwendung von alkoholischen und wässrigen Extrakten aus dem Mycel von G. pfeifferi als vitalisierende, schmerzlindernde und keimmindernde Nahrungsergänzungsmittel

[0128] Methodik: Der Schutz der Zellen vor toxischen Radikalen, nachgewiesen nach Beispiel E, kann auch als ernährungsphysiologisch bedeutsam bei dem Einsatz von Nanopartikel gewonnen aus Pilzen der Gattungen Auricularia , Ganoderma, Grifola, Hericium und Lentinu-

la und supplementiert mit Kofaktoren antioxidativer Systeme wie Thiocyanat und Vitamin C und E und Spurenelemente als Nahrungsergänzungsmittel bedeutsam sein.

[0129] Dieser für Nanopartikel gewonnen aus der Biomasse von Pilzen spezifische Effekt wird sowie durch die mit der durch viele Beispiele belegten Immunstimulation durch Thiocyanate sehr vorteilhaft ergänzt. Insbesondere bei Pilzen der Gattung ist ebenfalls eine Immunstimulation gut belegt. Es kommt also zu einem synergistischen Effekt. Andererseits kann die spezifisch inhibierende Wirkung der Extrakte aus *G. pfeifferi* auf die neutrale Endopeptidase zur Schmerzlinderung genutzt werden, da nach sie im Sinne einer Hemmung der Enkephalinase mit dem Abbau von Neuropeptiden und Endorphinen, die an den Opiat-Rezeptoren angreifen, interferieren.

[0130] Ergebnis: Die Kombination von Radikalfängereigenschaften, immunstimulierender Wirkung, schmerzlindernder Wirkung und gegen mikrobiellen Verderb konservierenden Eigenschaften schafft sehr günstige Voraussetzungen für eine Anwendung als Nahrungsergänzungstoff.

Beispiel 31 : Verwendung als Gesundheitspflegemittel und Nahrungsergänzungstoff

[0131] Methodik: Wässrige und alkoholische Extrakte sowie aus der Biomasse gewonnene Nanopartikel aus Pilzen der Gattung *Ganoderma* hemmen die Cholesterolakкумуляtion in kultivierten humanen Aortenintimazellen. Durch Hemmung der neutralen Endopeptidase und des Angiotensin-Konverting-Enzyms nachgewiesen im Beispiel G wird in kaskadenartig organisierte Funktionen des Säureorganismus eingegriffen. Thiocyanate führen zu einer höheren Polarisierung der Zellmembranen. Durch die nachgewiesene Hemmung der neutralen Endopeptidase Hemmung wird nach Melzig et al., Pharmazie 51 (1996), 501-503 eine Steigerung der renalen Natriumausscheidung und damit eine Blutdrucksenkung bewirkt. Die im Beispiel F nachgewiesene Hemmung des Angiotensin-Konverting-Enzyms führt nach Gräfe (Biochemie der Antibiotika, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin New York, 1992) ebenfalls zu einer Blutdrucksenkung. Thiocyanat ist früher in großem Umfang zur Blutdrucksenkung eingesetzt worden.

[0132] Ergebnis: Da bei vielen Patienten mit metabolischem Syndrom ein erhöhter Cholesterinspiegel mit einem erhöhten Blutdruck kombiniert ist, werden die bekannten Wirkungen von Pilzen der Gattung *Ganoderma* bei *G. pfeifferi* sehr vorteilhaft durch die blutdrucksenkende Wirkung ergänzt.

[0133] Durch ethanolische Extrakte Mycel nach Beispiel 2 und 3 in Konzentrationen zwischen 0,1 und 0,2% wurde eine Hemmung der serumvermittelten Lipopolysacharid-Bindung um 40-60% erreicht.

[0134] Lipopolysacharide werden bei einer Infektion mit gramnegativen Bakterien aus deren Zellwand freigesetzt. Nach Bindung an das Lipopolysacharid-bindende Protein können sie Makrophagen sowie mononukleäre Zellen zur Freisetzung endogene Mediatoren anregen und so zu Fieber, Veränderungen im weißen Blutbild sowie zur abnormen Weitstellung der Gefäße in der Körperperipherie führen.

Legende zu den Figuren

Figur 1: Wachstumskurven der Biomasse *Ganoderma Pfeifferi* im SCN-haltigen Medium

Figur 2: Wachstumskurven der Biomasse *Ganoderma resinaceum* im SCN-haltigen Medium

Figur 3: Wachstumskurven der Biomasse *Ganoderma applanatum* im SCN-haltigen Medium

Figur 4: Wachstumskurven der Biomasse *Ganoderma adspesum* im SCN-haltigen Medium

Figur 5: Wirkung von Mikro- und Nanopartikeln aus Shii-take-Pilzen (hergestellt nach Beispiel 7 und 8) im Vergleich zur synergistischen Kombination von Shii-take-Pilzen mit Vitamin C

Figur 6: Nachweis der Unterbrechung von Infektketten, simuliert im Donator-Akzeptor-Modell, durch die erfindungsgemäße Zubereitung nach Beispiel 7 und 8

Figur 7: Wirkung von Mikro- und Nanopartikeln aus Shii-take hergestellt nach Beispiel 8

Figur 8: Nachweis der Unterbrechung von Infektketten, simuliert im Donator-Akzeptor-Modell, durch die erfindungsgemäße Zubereitung nach Beispiel 12

Figur 9: Teilchengrößenverteilung Mikro- und Nanopartikeln hergestellt nach Beispiel 8

Patentansprüche

1. Gesundheitsfördernde Mittel, bestehend aus Biomassen terrestrischer Pilze einerseits und anorganischen Thiocyanaten oder Thiocyanaten organischer Basen andererseits.
2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich ein oder mehrere Wirkstoffe enthalten.
3. Mittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich ein oder mehrere Mineralstoffe und/oder Radikalfänger und/oder Nahrungsergänzungsstoffe und/oder Vitamine, insbesondere Vitamin C, enthalten.
4. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich eine oder mehrere dispersionsstabilisierende Substanzen enthalten.
5. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als lipidhaltige terrestrische Pilze
 - a) *Auricularia auricula-judae* – Judasohr
 - b) *Ganoderma lucidum* – Glänzender Lackporling
 - c) *Grifola frondosa* – Maitake
 - d) *Hericiium erinaceus* – Igelstachelbart
 - e) *Lentinula edodes* – Shii-takeeingesetzt werden.
6. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Biomassen der Pilze in Mikro- und Nanopartikel umgewandelt werden.
7. Mittel nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikro- und Nanopartikel einen mittleren Durchmesser von 10 nm – 10 µm besitzen.
8. Verfahren zur Herstellung von gesundheitsfördernden Mitteln gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass
 - a) die Kultivierung der Pilze in Gegenwart von anorganischen Thiocyanaten oder Thiocyanaten organischer Basen erfolgt oder
 - b) der Biomasse des Mycels und/oder des Fruchtkörpers der Pilze anorganische Thiocy-

anate oder Thiocyanate organischer Basen zugesetzt werden.

9. Verfahren zur Herstellung von Zusammensetzungen gemäß Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass

- a) die Kultivierung der Pilze in Gegenwart von anorganischen Thiocyanaten oder Thiocyanaten organischer Basen und eine Anreicherung mit Wirkstoffen durch Zusätze zum Kulturmedium während der Kultivierung erfolgt oder
- b) der Biomasse des Mycels und/oder des Fruchtkörpers der Pilze anorganische Thiocyanate oder Thiocyanate organischer Basen und zusätzlich ein oder mehrere Wirkstoffe zugesetzt werden.

5 10. Verfahren zur Herstellung von Zusammensetzungen gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Biomassen oder die kultivierten Biomassen durch Homogenisierung oder Emulsionsbildung in Mikro- und Nanopartikel mit einem Durchmesser von 10 nm - 10 µm umgewandelt werden.

10 11. Verfahren nach Anspruch 10, gekennzeichnet durch folgende Schritte:

- Erwärmen der Biomassen Pilze bis zur Verflüssigung der darin enthaltenen Lipide
- ggf. Zusetzen eines oder mehrerer Wirkstoffe oder Zusätze
- Versetzen der Biomasse oder der beladenen Biomasse mit einem auf oberhalb der Schmelztemperatur der Fettsäuren erwärmten Tensid-Wasser-Gemisch und Vereinigung der beiden Phasen
- Herstellen einer Vorsuspension
- Hochdruckhomogenisierung in einem oder mehreren Homogenisationszyklen

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Erwärmen der Mikroorganismen und des Tensid-Wasser-Gemischs entfällt und die Wirkstoffe bei Raumtemperatur
15 an den lipidhaltigen Pilze adsorbiert oder bei Zusatz einer geringen Wassermenge dispergiert werden.

13. Verfahren nach Anspruch 10, gekennzeichnet durch folgende Schritte:

- Suspendieren der Biomasse der Pilze und ggf. der Zusätze in einem organischen Lösungsmittel und Vordispersieren dieses Gemischs

- Hochdruckhomogenisierung und anschließende Sprüh- oder Gefriertrocknung
- Redispergierung in einer wässrigen Tensidlösung
- erneute Dispergierung und Hochdruckhomogenisierung in einem oder mehreren Homogenisationszyklen

14. Verfahren nach Anspruch 10, gekennzeichnet durch folgende Schritte:

- Emulsionsbildung aus Wasser und Biomasse sowie ggf. mit den Zusätzen
- Lösen der Emulsion in einem geeigneten organischen Lösungsmittel
- Hinzufügen eines wasserlöslichen Co-Tensids und Vordispergierung
- Hochdruckhomogenisierung und Entfernung des Lösungsmittels.

15. Verwendung von Zusammensetzungen gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 als Wirkstoffträger.

16. Verwendung von Zusammensetzungen gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 als gesundheitsfördernde Mittel.

17. Verwendung von Zusammensetzungen gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung gesundheitsfördernder Mittel.

18. Verwendung von Zusammensetzungen gemäß den Ansprüchen 1 bis 7 für therapeutische und prophylaktische Anwendungen bei Mensch und/oder Tier.

19. Verwendung der Zusammensetzungen gemäß den Ansprüchen 1 bis 7 als

- a) Nahrungsmittel
- b) Futtermittel
- c) Nahrungsergänzungsmittel
- d) Futterergänzungsmittel

20. Verwendung nach Anspruch 19 als nutritive Futtermittel.

21. Verwendung nach Anspruch 18 und 19 zur Verbesserung der Aufzuchtergebnisse sowie zur Prophylaxe und Therapie von Infektionskrankheiten in der Tierhaltung und Tierzucht

22. Verwendung nach Anspruch 21 in Kombination mit anderen Arzneimitteln.

23. Verwendung nach Anspruch 15 als Antibiotikaträger.

5 24. Verwendung von Zusammensetzungen gemäß den Ansprüchen 1 bis 7 in Form von Ölen, Sprays und/Salben sowie in Kapseln.

25. Verwendung von Zusammensetzungen gemäß den Ansprüchen 1 bis 7 zur gezielten Substituierung von Mangelzuständen.

10

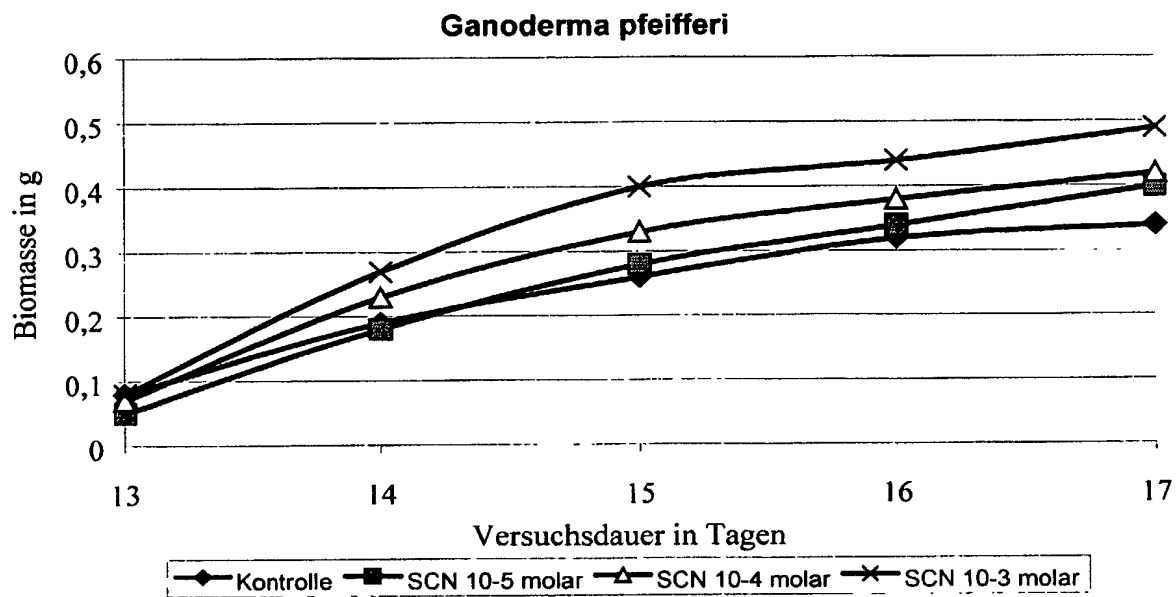
26. Verwendung von Zusammensetzungen gemäß den Ansprüchen 1 bis 7 zur Immunstimulation.

15

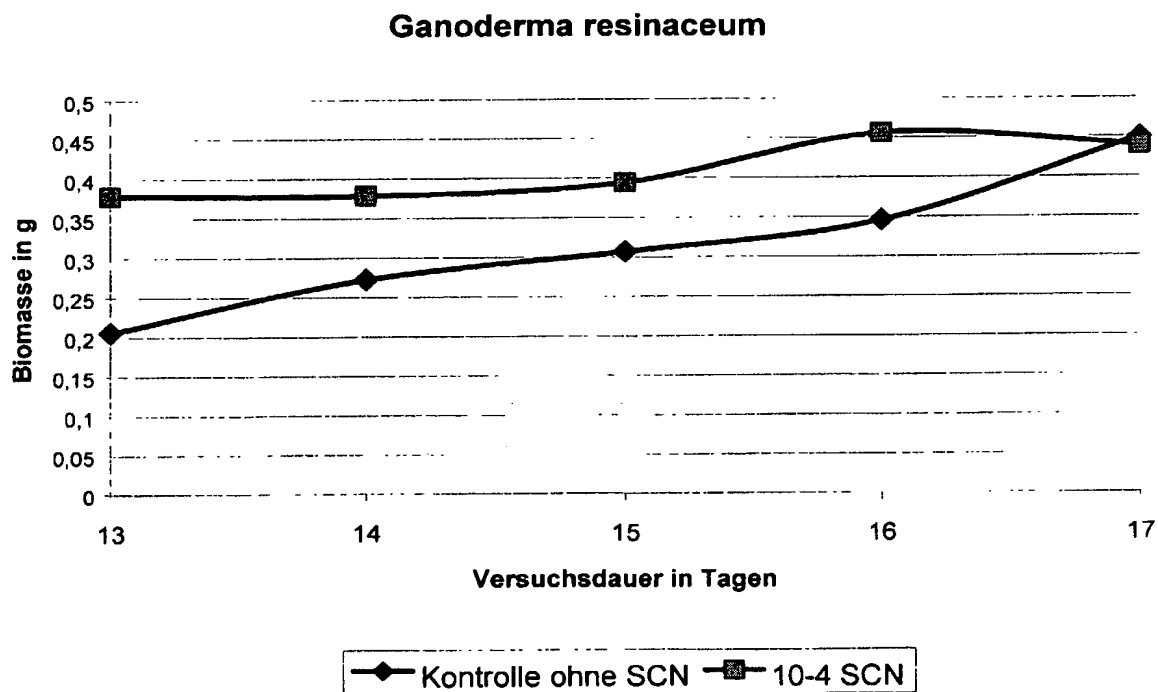
27. Verwendung von Zusammensetzungen gemäß den Ansprüchen 1 bis 7 zur gezielten Substituierung des Thiocyanatmangels bei Dialysepatienten.

Figur 1

1/5

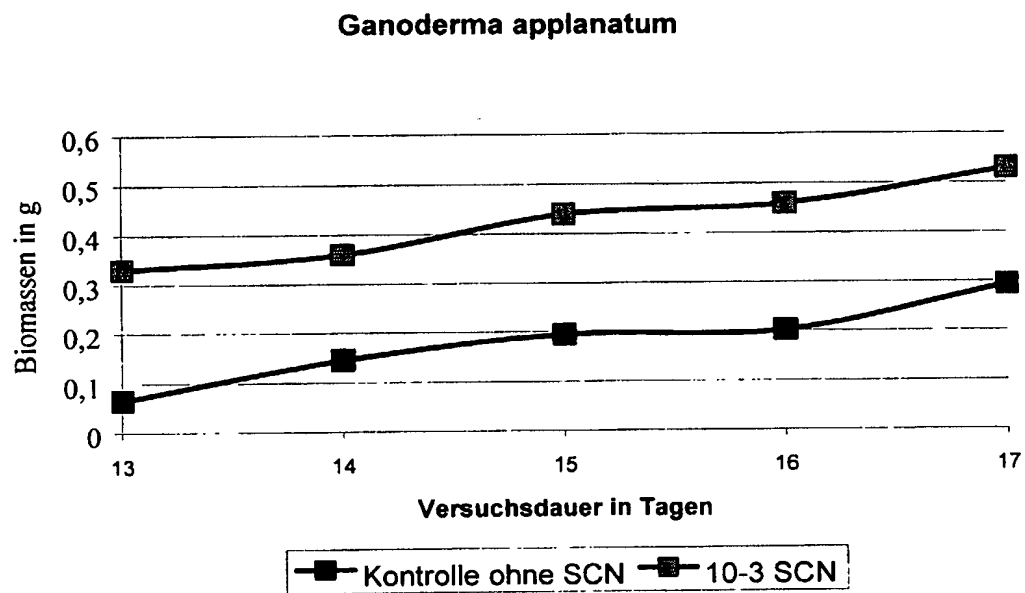


Figur 2

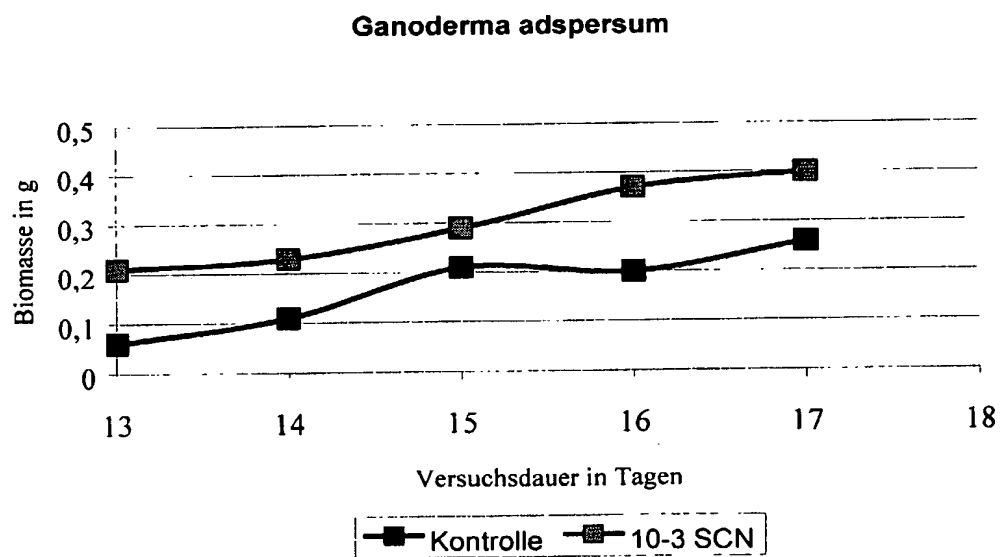


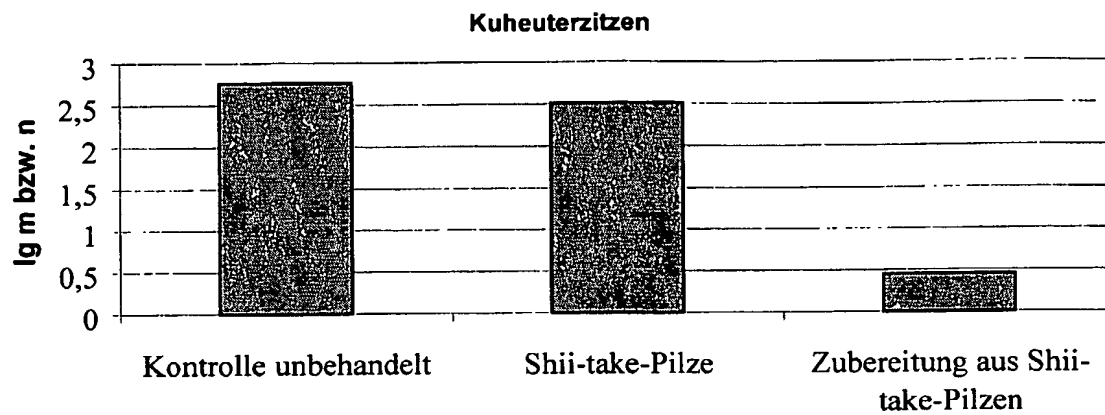
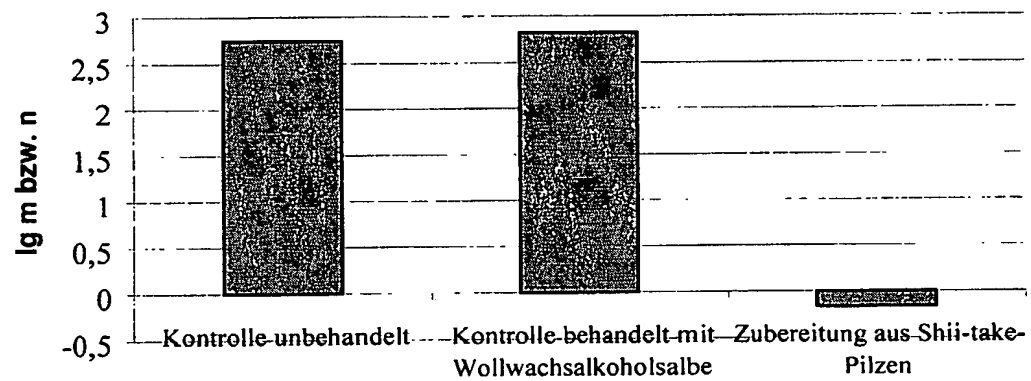
Figur 3

2/5



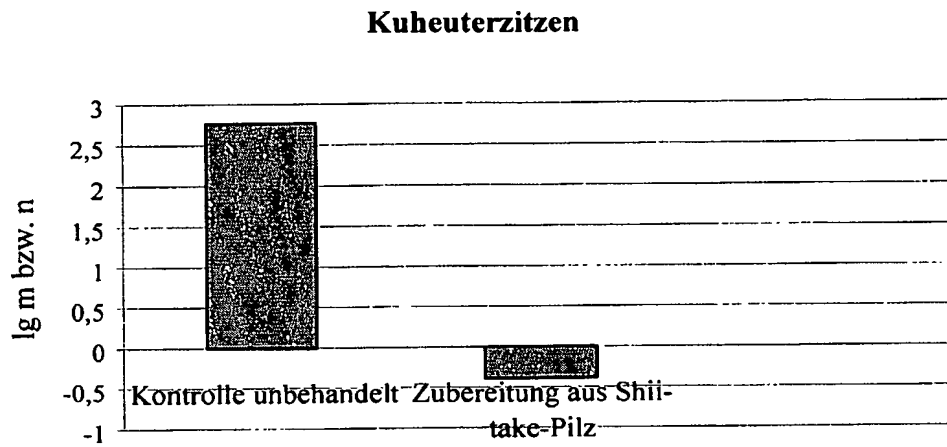
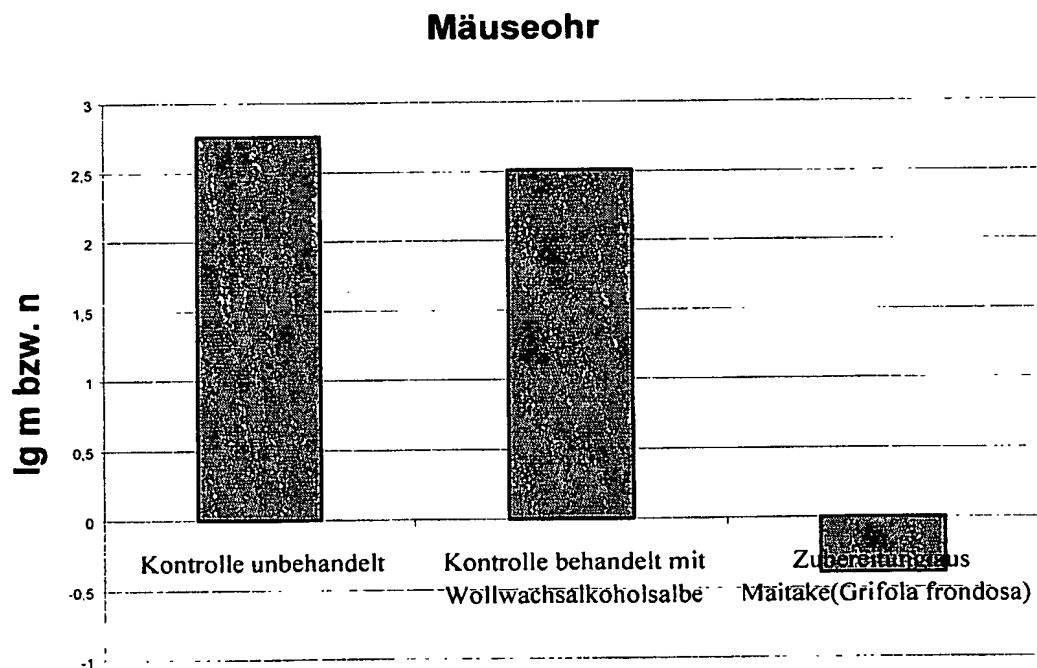
Figur 4

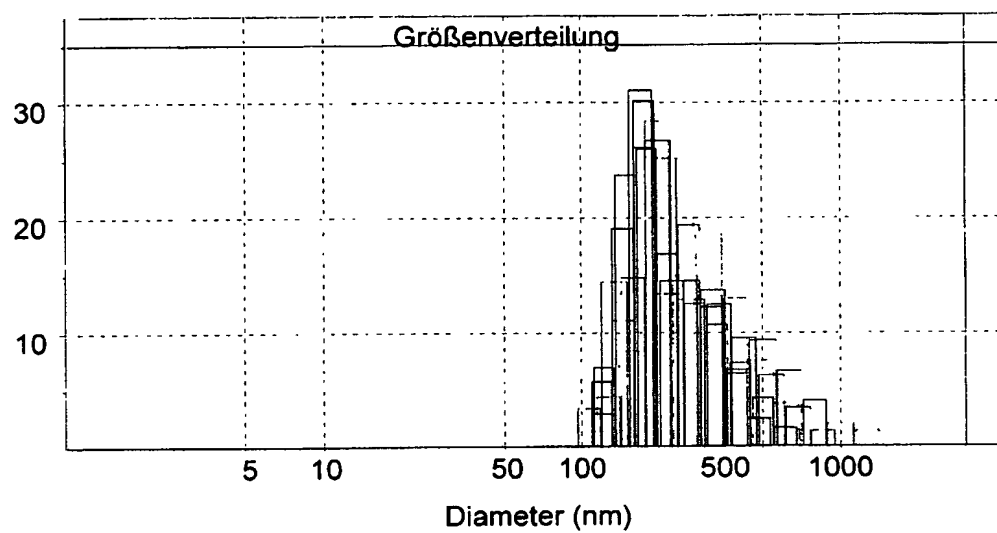


Figur 5**3/5****Figur 6****Mäuseohr**

Figur 7

4/5

**Figur 8**

Figur 9**5/5**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE2004/000421

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A23L1/28 A61K35/70 A61K35/84 A61K31/26 A61K31/275 A61K9/16 A61K9/51 A61P31/00 A61P37/04 A61P39/06		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K A23L A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	LINDEQUIST U ET AL: "New pharmacologically active substances from basidiomycetes" ZEITSCHRIFT FUR PHYTOTHERAPIE 1990 GERMANY, vol. 11, no. 5, 1990, pages 139-149, XP009038984 ISSN: 0722-348X the whole document	1-27
Y	US 5 595 742 A (FUJIWARA HIROSHI ET AL) 21 January 1997 (1997-01-21) the whole document	1-27
Y	DE 199 11 679 A (JUELICH WOLF DIETER ; LINDEQUIST ULRIKE (DE)) 12 October 2000 (2000-10-12) examples	1-5, 15-27
----- -/--		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex </div>		
* Special categories of cited documents <div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>*G* document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search	Date of making of the international search report	
9 November 2004	26/11/2004	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Pacreu Largo, M	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE2004/000421

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	ZHU M ET AL: "Triterpene antioxidants from ganoderma lucidum." PHYTOTHERAPY RESEARCH : PTR. SEP 1999, vol. 13, no. 6, September 1999 (1999-09), pages 529-531, XP009039005 ISSN: 0951-418X abstract	1-5, 15-27
Y	MORIGIWA AIKO ET AL: "Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from ganoderma lucidum" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, TOKYO, JP, vol. 34, no. 7, 1986, pages 3025-3028, XP002966834 ISSN: 0009-2363 abstract	1-5, 15-27
Y	WO 00/53207 A (LINDEQUIST ULRIKE ; JANSEN ROLF (DE); MOTHANA RAMZI (DE); JUELICH WOLF) 14 September 2000 (2000-09-14) page 1 - page 13; examples 49,50,53-59	1-5, 15-27
Y	SUZUKI I ET AL: "ANTITUMOR AND IMMUNOMODULATING ACTIVITIES OF A BETA-GLUCAN OBTAINED FROM LIQUID-CULTURED GRIFOLA FRONDOSA" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO, JP, vol. 37, no. 2, 1989, pages 410-413, XP001068921 ISSN: 0009-2363 abstract	1-5, 15-27
Y	OHTSURU M ET AL: "Effects of administration of Grifola frondosa on blood pressure and body weight in spontaneously hypertensive rats. I. Bioactive substances in Grifola frondosa" FSTA, 1999, XP002171271 abstract	1-5, 15-27
Y	MIZUNO T: "BIOACTIVE SUBSTANCES IN YAMABUSHITAKE, THE HERICIUM ERINACEUM FUNGUS, AND ITS MEDICINAL UTILIZATION" FOODS AND FOOD INGREDIENTS JOURNAL OF JAPAN, FFI JANARU HENSHU IINKAI, TOYONAKA, JP, no. 175, 1998, pages 105-114, XP000981334 ISSN: 0919-9772 abstract	1-5, 15-27

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE2004/000421

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	HIRASAWA MASATOMO ET AL: "Three kinds of antibacterial substances from Lentinus edodes (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom)" INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS, vol. 11, no. 2, February 1999 (1999-02), pages 151-157, XP002304690 ISSN: 0924-8579 abstract -----	1-5, 15-27
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 198731 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1987-216848 XP002304692 & JP 62 142119 A (NAGAOKA H) 25 June 1987 (1987-06-25) abstract -----	1-5, 15-27
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 198709 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1987-059542 XP002304693 & JP 62 012721 A (MORITA M) 21 January 1987 (1987-01-21) abstract -----	1-5, 15-27
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 198833 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1988-235050 XP002304694 & WO 88/05660 A (NIKKEI CO LTD) 11 August 1988 (1988-08-11) abstract -----	1-5, 15-27
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 0082, no. 46 (C-251), 10 November 1984 (1984-11-10) & JP 59 124984 A (MORINAGA SEIKA KK), 19 July 1984 (1984-07-19) abstract -----	1-5, 15-27

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE2004/000421

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	<p>WEUFFEN W ET AL: "THE THIOCYANATE ION AS A PHYSIOLOGICALLY SIGNIFICANCE ACTIVE SUBSTANCE IN LIVING NATURE" DIE PHARMAZIE, vol. 45, no. 1, 1990, pages 16-29, XP001184080 ISSN: 0031-7144 cited in the application page 19, last paragraph - page 21 page 23, paragraph 4.11 page 24, paragraph 5</p>	1-27
Y	<p>WEUFFEN W ET AL: "DIE PROTEKTIVE WIRKUNG VON RHODANIDEN BEIM VERSUCHS- UND NUTZTIER PROTECTIVE EFFECT OF RHODANATES IN LABORATORY AND FARM ANIMALS" ARCHIV FUER EXPERIMENTELLE VETERINAERMEDIZIN, HIRZEL VERLAG, LEIPZIG, DE, vol. 29, no. 6, December 1975 (1975-12), pages 955-962, XP001084624 ISSN: 0003-9055 page 959, last paragraph - page 961</p>	1,15-21, 24-26
Y	<p>WEUFFEN W ET AL: "ALIMENTAERE AUFNAHME DES THIOCYANATES SOWIE DESSEN VORKOMMEN IN EINIGEN ORGANEN, KOERPERFLUESSIGKEITEN UND IM VERDAUUNGSTRAKT DES JUNGRINDESTS" MONATSHEFTE FUER VETERINAERMEDIZIN, JENA, DE, vol. 45, no. 24, 1990, pages 873-877, XP001083811 ISSN: 0026-9263 abstract</p>	1,15-21, 24-26
A	<p>EP 0 189 800 A (BAYER AG) 6 August 1986 (1986-08-06) abstract</p>	1,8,9
A	<p>EP 0 433 616 A (DEGUSSA) 26 June 1991 (1991-06-26) abstract</p>	1,8,9
A	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1996, no. 10, 31 October 1996 (1996-10-31) & JP 8 157313 A (SOMAR CORP), 18 June 1996 (1996-06-18) abstract</p>	1,8,9
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE2004/000421

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	<p>MUNDT SABINE ET AL: "Nanoparticles of marine sources as new pharmaceutical and cosmetical application form." BIOMOLECULAR ENGINEERING, vol. 20, no. 2, 25 February 2003 (2003-02-25), page 75, XP002304691 & MARINE BIOTECHNOLOGY: BASICS AND APPLICATIONS; SPAIN; FEBRUARY 25-MARCH 01, 2003 ISSN: 1389-0344 abstract</p> <p>-----</p>	1,6,7, 10-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE2004/000421

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5595742	A	21-01-1997	JP 2711202 B2 JP 6116162 A AT 166787 T CA 2088732 A1 CN 1085101 A ,B DE 69318921 D1 DE 69318921 T2 EP 0591603 A2 KR 165132 B1	10-02-1998 26-04-1994 15-06-1998 07-04-1994 13-04-1994 09-07-1998 10-12-1998 13-04-1994 18-02-1999
DE 19911679	A	12-10-2000	DE 19911679 A1 AT 243042 T AU 3657600 A DE 50002587 D1 WO 0053207 A1 EP 1158995 A1 JP 2002538215 A US 6726911 B1	12-10-2000 15-07-2003 28-09-2000 24-07-2003 14-09-2000 05-12-2001 12-11-2002 27-04-2004
WO 0053207	A	14-09-2000	DE 19911679 A1 DE 19911680 A1 AT 243042 T AU 3657600 A DE 50002587 D1 WO 0053207 A1 EP 1158995 A1 JP 2002538215 A US 6726911 B1	12-10-2000 28-12-2000 15-07-2003 28-09-2000 24-07-2003 14-09-2000 05-12-2001 12-11-2002 27-04-2004
JP 62142119	A	25-06-1987	JP 1807585 C JP 5017890 B	10-12-1993 10-03-1993
JP 62012721	A	21-01-1987	NONE	
WO 8805660	A	11-08-1988	WO 8805660 A1	11-08-1988
JP 59124984	A	19-07-1984	NONE	
EP 0189800	A	06-08-1986	DE 3502926 A1 AU 5277086 A BR 8600355 A DD 248953 A5 DK 44186 A EP 0189800 A2 ES 8702354 A1 GR 860245 A1 HU 42434 A2 IE 860257 L JP 61176561 A PT 81882 A ,B ZA 8600653 A	31-07-1986 07-08-1986 14-10-1986 26-08-1987 31-07-1986 06-08-1986 16-03-1987 21-05-1986 28-07-1987 30-07-1986 08-08-1986 01-02-1986 26-11-1986
EP 0433616	A	26-06-1991	DE 3942433 A1 EP 0433616 A2	27-06-1991 26-06-1991
JP 8157313	A	18-06-1996	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/000421

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A23L1/28 A61K35/70 A61K35/84 A61K31/26 A61K31/275
A61K9/16 A61K9/51 A61P31/00 A61P37/04 A61P39/06

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K A23L A61P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr
Y	LINDEQUIST U ET AL: "New pharmacologically active substances from basidiomycetes" ZEITSCHRIFT FÜR PHYTOTHERAPIE 1990 GERMANY, Bd. 11, Nr. 5, 1990, Seiten 139-149, XP009038984 ISSN: 0722-348X das ganze Dokument	1-27
Y	US 5 595 742 A (FUJIWARA HIROSHI ET AL) 21. Januar 1997 (1997-01-21) das ganze Dokument	1-27
Y	DE 199 11 679 A (JUELICH WOLF DIETER ; LINDEQUIST ULRICH (DE)) 12. Oktober 2000 (2000-10-12) Beispiele	1-5, 15-27
	----- -/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. November 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

26/11/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Pacreu Largo, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/000421

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	ZHU M ET AL: "Triterpene antioxidants from ganoderma lucidum." PHYTOTHERAPY RESEARCH : PTR. SEP 1999, Bd. 13, Nr. 6, September 1999 (1999-09), Seiten 529-531, XP009039005 ISSN: 0951-418X Zusammenfassung	1-5, 15-27
Y	MORIGIWA AIKO ET AL: "Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from ganoderma lucidum" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, TOKYO, JP, Bd. 34, Nr. 7, 1986, Seiten 3025-3028, XP002966834 ISSN: 0009-2363 Zusammenfassung	1-5, 15-27
Y	WO 00/53207 A (LINDEQUIST ULRIKE ; JANSEN ROLF (DE); MOTHANA RAMZI (DE); JUELICH WOLF) 14. September 2000 (2000-09-14) Seite 1 - Seite 13; Beispiele 49,50,53-59	1-5, 15-27
Y	SUZUKI I ET AL: "ANTITUMOR AND IMMUNOMODULATING ACTIVITIES OF A BETA-GLUCAN OBTAINED FROM LIQUID-CULTURED GRIFOLA FRONDOSA" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO, JP, Bd. 37, Nr. 2, 1989, Seiten 410-413, XP001068921 ISSN: 0009-2363 Zusammenfassung	1-5, 15-27
Y	OHTSURU M ET AL: "Effects of administration of Grifola frondosa on blood pressure and body weight in spontaneously hypertensive rats. I. Bioactive substances in Grifola frondosa" FSTA, 1999, XP002171271 Zusammenfassung	1-5, 15-27
Y	MIZUNO T: "BIOACTIVE SUBSTANCES IN YAMABUSHITAKE, THE HERICIUM ERINACEUM FUNGUS, AND ITS MEDICINAL UTILIZATION" FOODS AND FOOD INGREDIENTS JOURNAL OF JAPAN, FFI JANARU HENSHU IINKAI, TOYONAKA, JP, Nr. 175, 1998, Seiten 105-114, XP000981334 ISSN: 0919-9772 Zusammenfassung	1-5, 15-27

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/000421

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	HIRASAWA MASATOMO ET AL: "Three kinds of antibacterial substances from Lentinus edodes (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom)" INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS, Bd. 11, Nr. 2, Februar 1999 (1999-02), Seiten 151-157, XP002304690 ISSN: 0924-8579 Zusammenfassung -----	1-5, 15-27
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 198731 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1987-216848 XP002304692 & JP 62 142119 A (NAGAOKA H) 25. Juni 1987 (1987-06-25) Zusammenfassung -----	1-5, 15-27
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 198709 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1987-059542 XP002304693 & JP 62 012721 A (MORITA M) 21. Januar 1987 (1987-01-21) Zusammenfassung -----	1-5, 15-27
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 198833 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1988-235050 XP002304694 & WO 88/05660 A (NIKKEI CO LTD) 11. August 1988 (1988-08-11) Zusammenfassung -----	1-5, 15-27
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Bd. 0082, Nr. 46 (C-251), 10. November 1984 (1984-11-10) & JP 59 124984 A (MORINAGA SEIKA KK), 19. Juli 1984 (1984-07-19) Zusammenfassung -----	1-5, 15-27

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/000421

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitrag Anspruch Nr.
Y	<p>WEUFFEN W ET AL: "THE THIOCYANATE ION AS A PHYSIOLOGICALLY SIGNIFICANT ACTIVE SUBSTANCE IN LIVING NATURE"</p> <p>DIE PHARMAZIE, Bd. 45, Nr. 1, 1990, Seiten 16-29, XP001184080 ISSN: 0031-7144 in der Anmeldung erwähnt Seite 19, letzter Absatz - Seite 21 Seite 23, Absatz 4.11 Seite 24, Absatz 5</p>	1-27
Y	<p>WEUFFEN W ET AL: "DIE PROTEKTIVE WIRKUNG VON RHODANIDEN BEIM VERSUCHS- UND NUTZTIER PROTECTIVE EFFECT OF RHODANATES IN LABORATORY AND FARM ANIMALS"</p> <p>ARCHIV FÜR EXPERIMENTELLE VETERINÄRMEDIZIN, HIRZEL VERLAG, LEIPZIG, DE, Bd. 29, Nr. 6, Dezember 1975 (1975-12), Seiten 955-962, XP001084624 ISSN: 0003-9055 Seite 959, letzter Absatz - Seite 961</p>	1,15-21, 24-26
Y	<p>WEUFFEN W ET AL: "ALIMENTÄRE AUFNAHME DES THIOCYANATES SOWIE DESSEN VORKOMMEN IN EINIGEN ORGANEN, KÖRPERFLÜESSIGKEITEN UND IM VERDAUUNGSTRAKT DES JUNGRINDESTES"</p> <p>MONATSSHEFTE FÜR VETERINÄRMEDIZIN, JENA, DE, Bd. 45, Nr. 24, 1990, Seiten 873-877, XP001083811 ISSN: 0026-9263 Zusammenfassung</p>	1,15-21, 24-26
A	<p>EP 0 189 800 A (BAYER AG) 6. August 1986 (1986-08-06) Zusammenfassung</p>	1,8,9
A	<p>EP 0 433 616 A (DEGUSSA) 26. Juni 1991 (1991-06-26) Zusammenfassung</p>	1,8,9
A	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Bd. 1996, Nr. 10, 31. Oktober 1996 (1996-10-31) & JP 8 157313 A (SOMAR CORP), 18. Juni 1996 (1996-06-18) Zusammenfassung</p>	1,8,9
	-/--	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/000421

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr
A	<p>MUNDT SABINE ET AL: "Nanoparticles of marine sources as new pharmaceutical and cosmetrical application form."</p> <p>BIOMOLECULAR ENGINEERING, Bd. 20, Nr. 2, 25. Februar 2003 (2003-02-25), Seite 75, XP002304691</p> <p>& MARINE BIOTECHNOLOGY: BASICS AND APPLICATIONS; SPAIN; FEBRUARY 25-MARCH 01, 2003</p> <p>ISSN: 1389-0344</p> <p>Zusammenfassung -----</p>	1,6,7, 10-14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/000421

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5595742 A	21-01-1997	JP 2711202 B2	10-02-1998
		JP 6116162 A	26-04-1994
		AT 166787 T	15-06-1998
		CA 2088732 A1	07-04-1994
		CN 1085101 A , B	13-04-1994
		DE 69318921 D1	09-07-1998
		DE 69318921 T2	10-12-1998
		EP 0591603 A2	13-04-1994
		KR 165132 B1	18-02-1999
DE 19911679 A	12-10-2000	DE 19911679 A1	12-10-2000
		AT 243042 T	15-07-2003
		AU 3657600 A	28-09-2000
		DE 50002587 D1	24-07-2003
		WO 0053207 A1	14-09-2000
		EP 1158995 A1	05-12-2001
		JP 2002538215 A	12-11-2002
		US 6726911 B1	27-04-2004
WO 0053207 A	14-09-2000	DE 19911679 A1	12-10-2000
		DE 19911680 A1	28-12-2000
		AT 243042 T	15-07-2003
		AU 3657600 A	28-09-2000
		DE 50002587 D1	24-07-2003
		WO 0053207 A1	14-09-2000
		EP 1158995 A1	05-12-2001
		JP 2002538215 A	12-11-2002
		US 6726911 B1	27-04-2004
JP 62142119 A	25-06-1987	JP 1807585 C	10-12-1993
		JP 5017890 B	10-03-1993
JP 62012721 A	21-01-1987	KEINE	
WO 8805660 A	11-08-1988	WO 8805660 A1	11-08-1988
JP 59124984 A	19-07-1984	KEINE	
EP 0189800 A	06-08-1986	DE 3502926 A1	31-07-1986
		AU 5277086 A	07-08-1986
		BR 8600355 A	14-10-1986
		DD 248953 A5	26-08-1987
		DK 44186 A	31-07-1986
		EP 0189800 A2	06-08-1986
		ES 8702354 A1	16-03-1987
		GR 860245 A1	21-05-1986
		HU 42434 A2	28-07-1987
		IE 860257 L	30-07-1986
		JP 61176561 A	08-08-1986
		PT 81882 A , B	01-02-1986
		ZA 8600653 A	26-11-1986
EP 0433616 A	26-06-1991	DE 3942433 A1	27-06-1991
		EP 0433616 A2	26-06-1991
JP 8157313 A	18-06-1996	KEINE	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.